

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*CAMILA PATRICIO BRAGA FILGUEIRA*

Ensaio moleculares quantitativos e baseados em temperatura de dissociação do DNA para diagnóstico específico da infecção por *Leishmania* spp.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientadoras:** Prof. Dra. Mariana Côrtes Boité

Prof. Dra. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto

**RIO DE JANEIRO**

2018

Filgueira, Camila Patricio Braga .

Ensaio moleculares quantitativos e baseados em temperatura de dissociação do DNA para diagnóstico específico da infecção por *Leishmania* spp. / Camila Patricio Braga Filgueira. - Rio de Janeiro, 2018.  
177 f.; il.

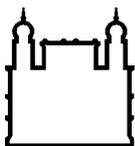
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Mariana Côrtes Boité.  
Co-orientadora: Constança Felicia de Paoli de Carvalho Britto.

Bibliografia: f. 106-131

1. *Leishmania*. 2. qPCR. 3. HRM. 4. Identificação de espécies. 5. Quantificação de amostras clínicas. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**CAMILA PATRICIO BRAGA FILGUEIRA**

**Ensaio moleculares quantitativos e baseados em temperatura de  
dissociação do DNA para diagnóstico específico da infecção por  
*Leishmania* spp.**

**ORIENTADORAS: Prof. Dra. Mariana Côrtes Boité**

**Prof. Dra. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto**

**Aprovada em: 21/06/18**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Alda Maria da Cruz - **Presidente**

**Prof. Dr.** Milton Ozório Moraes

**Prof. Dr.** Gustavo Adolfo Sierra Romero

**Prof. Dra.** Aline Fagundes da Silva

**Prof. Dr.** Adeilton Alves Brandão

Rio de Janeiro, 21 de junho de 2018



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

## DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Camila Patricio Braga Figueira**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto e da Dr<sup>a</sup>. Mariana Côrtes Boité, foi aprovada em 21/06/2018, em sua defesa de dissertação de mestrado intitulada: **“Ensaio moleculares quantitativos e baseados em temperatura de dissociação do DNA para diagnóstico específico da infecção por *Leishmania spp*”**, área de concentração: Biologia Celular e Molecular. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr. Milton Ozório Moraes - IOC/FIOCRUZ e Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero - UnB/DF e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Aline Fagundes da Silva - INI/FIOCRUZ e Dr. Adeilton Alves Brandão - IOC/FIOCRUZ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria n° 694, de 13 de junho de 1995, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 7 (sete) na última avaliação quadrienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, **a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 21 de junho de 2018

  
Leila de Mendonça Lima  
Matrícula SIAPE 11919958

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob n° DCE-7610/18 no livro n°II, folha 22v em 21/06/2018.

## Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, meus queridos pais, meu irmão e meu namorado, por me ensinarem a cada dia os verdadeiros valores da vida, além de todo o apoio e suporte que me permitiram chegar até aqui.

## **Agradecimentos**

Às minhas orientadoras, Dra. Mariana Côrtes Boité e Dra. Constança Britto por todo o ensinamento que me foi passado, pelo auxílio e orientação na execução deste trabalho.

À Dra. Elisa Cupolillo, pelo apoio, compreensão e contribuição concedidos durante todo o período de realização deste estudo.

Ao Dr. Otacilio da Cruz Moreira, pela orientação e contribuição fundamentais para que este trabalho pudesse ser realizado, e por todo o ensinamento sobre qPCR e as diferentes técnicas moleculares.

À Dra. Daniela de Pita Pereira, pelo acompanhamento e todo o auxílio durante este trabalho, principalmente nas reações e análises de HRM.

À Dra. Luiza Pereira, por estar sempre disponível para ajudar e esclarecer minhas dúvidas que surgiam ao longo do estudo.

Aos demais pesquisadores e funcionários do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, principalmente à Barbara Neves e à Fernanda Morgado, pelos conselhos e apoio neste período.

Aos meus colegas de laboratório, que sempre estavam dispostos a ajudar com qualquer coisa que precisasse, e a dividir seus conhecimentos comigo, além dos momentos de descontração, que tornavam nossa rotina no laboratório mais agradável, fazendo do trabalho sempre uma alegria.

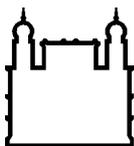
Às minhas amigas do laboratório Caroline Batista e Érika Costa, por estarem sempre comigo nestes dois anos de mestrado, e além deles, me apoiando e ajudando no que eu precisasse.

Ao meu namorado Henry, por toda a compreensão e apoio, estando sempre ao meu lado me dando o suporte necessário, inclusive nos momentos difíceis, durante todo esse período.

Aos meus pais, pelo apoio, compreensão e exemplo, sempre constantes, na minha vida.

Aos meus amigos, pelo suporte, conselhos e apoio de sempre.

A Deus, por ter me dado esta maravilhosa oportunidade de adquirir conhecimento, crescer, além de ter permitido que eu conhecesse essas pessoas maravilhosas que ficarão para sempre na minha vida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

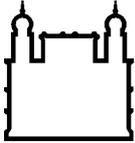
### Ensaio moleculares quantitativos e baseados em temperatura de dissociação do DNA para diagnóstico específico da infecção por *Leishmania* spp.

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Camila Patricio Braga Filgueira**

A leishmaniose é uma doença negligenciada, presente na Europa, Ásia, África e nas Américas, abrangendo infecções assintomáticas e duas formas clínicas principais: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela fêmea de flebotomíneos vetores. Sabe-se que as diferentes espécies de *Leishmania* estão associadas às diferentes formas clínicas da doença e ao seu prognóstico. O diagnóstico da leishmaniose é feito a partir da combinação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, mas principalmente através do isolamento e cultivo dos parasitos, que pode ser seguido de ensaio de isoenzimas para identificação da espécie. Este processo, contudo, tem baixa eficiência, além de demandar tempo e recursos que podem ser minimizados com a utilização de abordagem molecular diretamente em material clínico. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) tem sido amplamente utilizada para detecção da infecção por *Leishmania* e para a quantificação da sua carga parasitária, por se tratar de uma metodologia simples, rápida e extremamente sensível, capaz de detectar concentrações muito baixas de parasitos presentes em uma amostra. A análise de curvas de dissociação por *High Resolution Melting* (HRM) tem como principal vantagem permitir investigar toda a região amplificada pelos iniciadores e tem sido utilizada para a identificação de espécies por apresentar uma sensibilidade capaz de identificar diferenças de até um nucleotídeo entre sequências de DNA. A realização de um estudo que estabeleça uma metodologia capaz de detectar e identificar espécies de *Leishmania*, e que inclua uma validação analítica para uma padronização adequada e permita a determinação da carga parasitária em paralelo, para possibilitar a associação desses dados, ainda se faz necessária. Assim, o objetivo deste trabalho é estabelecer uma metodologia baseada em qPCR e HRM, que dispense o isolamento e cultivo do parasito, e que permita a detecção, identificação de espécies de *Leishmania* e a quantificação da carga parasitária diretamente em material clínico. Para isso, as metodologias de qPCR e HRM foram padronizadas com cepas de referência e posteriormente validadas com amostras clínicas de pacientes de Rondônia, Brasil, diagnosticados com leishmaniose cutânea, sendo realizada a quantificação da carga parasitária por qPCR e a identificação da espécie envolvida por HRM. Os resultados apontam que o alvo HSP70 é melhor indicado para determinar a carga parasitária de *Leishmania*. Além disso, estabelecemos um algoritmo para a identificação das principais espécies de *Leishmania* de relevância clínica por HRM, a partir da combinação de dois alvos moleculares, HSP70 e COI.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Ensaio moleculares quantitativos e baseados em temperatura de dissociação do DNA para diagnóstico específico da infecção por *Leishmania* spp.**

### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Camila Patricio Braga Filgueira**

Leishmaniasis is a neglected disease present in Europe, Asia, Africa and Americas encompassing asymptomatic infections and two main clinical forms: Visceral Leishmaniasis (VL) and Cutaneous Leishmaniasis (CL). It is caused by protozoan parasites from *Leishmania* genus, transmitted by sand fly vectors. It is known that different *Leishmania* species are associated with different clinical forms of the disease and its prognosis. Diagnosis of leishmaniasis usually combine clinical, epidemiological and laboratory data, involving isolation and parasite cultivation followed by isoenzymatic assay for species identification. However, this process has low efficiency and requires time and resources that can be minimized by applying molecular approach directly in clinical samples. Real Time PCR technique (qPCR) has been widely used to detect *Leishmania* infection and to quantify parasite load, once it is a simple, rapid and extremely sensitive methodology, capable to detect very low parasite concentrations. High Resolution Melting curve analysis allows the entire investigation of amplified region and has been used for species identification since it presents a sensitivity capable of identify differences of a single nucleotide in DNA sequences. Current methods are unable to simultaneously detect and identify *Leishmania* or quantify the parasite load. An improvement on these methods that includes analytical validation, standartization and data association is still needed. Thus, the purpose of this study is to stablish a methodology based on qPCR and HRM that allows detection, species identification and parasite load, directly from clinical samples, without the need of parasite isolation and cultivation. Thereby, qPCR and HRM methodologies were standardized using reference strains e subsequently validated with clinical samples from patients with cutaneous leishmaniasis from Rondônia, Brasil. Parasite load by qPCR and species identification by HRM were performed. The results obtained show that HSP70 is the best target to determine parasite load of *Leishmania* by qPCR. Furthermore, an algorithm was developed for identification of main *Leishmania* species with clinical relevance by HRM, using two molecular targets, HSP70 and COI.

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1 As leishmanioses.....	1
1.1.1 Ciclo biológico.....	1
1.2 O vetor.....	3
1.3 O Parasito e sua diversidade genética.....	4
1.4 Taxonomia e identificação de espécies do gênero <i>Leishmania</i> .....	6
1.5 Aspectos epidemiológicos.....	11
1.6 Diagnóstico.....	13
1.6.1 A qPCR no diagnóstico de <i>Leishmania</i> .....	16
1.6.2 Principais marcadores utilizados em <i>Leishmania</i> para identificação de espécies.....	18
1.6.3 O uso de metodologias baseadas em qPCR e análise da curva de dissociação na identificação de espécies de <i>Leishmania</i> .....	20
1.7 Justificativa.....	26
2. Objetivos.....	27
3. Material e Métodos.....	28
3.1 Amostras.....	28
3.1.1 Cepas e amostras de DNA.....	28
3.1.2 Amostras clínicas.....	28
3.2 Cultivo dos parasitas, preparo de massas e extração de DNA para HRM.....	29
3.3 Produção de massas de parasitos e posterior extração de DNA das cepas utilizadas nas reações de qPCR.....	30
3.4 Reações de qPCR.....	30
3.4.1 Padronização das reações de qPCR.....	31
3.4.2 Ensaio de linearidade, especificidade e sensibilidade do qPCR.....	32
3.4.3 Validação da qPCR com amostras clínicas.....	33
3.4.4 Quantificação das amostras de pacientes.....	33
3.4.5 Análises estatísticas.....	34
3.5 HRM – <i>High Resolution Melting</i> .....	35
3.5.1 HSP70.....	35

3.5.1.1	Padronização.....	35
3.5.1.2	Ensaio de reprodutibilidade.....	37
3.5.1.3	Aplicação em amostras clínicas.....	37
3.5.2	COI.....	38
3.5.2.1	Padronização HRM – COI.....	43
3.5.3	Análise dos resultados de HRM.....	44
3.5.4	Sequenciamento.....	44
4.	Resultados.....	45
4.1	qPCR.....	45
4.1.1	Determinação das concentrações de iniciadores e sondas.....	45
4.1.2	Ensaio de linearidade.....	46
4.1.3	Ensaio de especificidade e sensibilidade.....	47
4.1.4	Quantificação das amostras de pacientes e comparação dos alvos.....	49
4.2	HRM.....	58
4.2.1	HSP70 c.....	58
4.2.1.1	Padronização.....	58
4.2.1.2	Reprodução dos protocolos descritos por Zampieri <i>et al.</i> 2016.....	60
4.2.1.2.1	Padronização.....	60
4.2.1.2.2	Validação com cepas de promastigotas.....	64
4.2.1.2.3	Sequenciamento.....	68
4.2.1.2.4	Ensaio de reprodutibilidade.....	73
4.2.1.2.5	Validação com amostras clínicas.....	75
4.2.2	COI.....	85
4.2.2.1	Padronização.....	85
4.2.2.2	Teste dos iniciadores.....	85
4.2.3	Algoritmo para identificação de <i>Leishmania</i> por HRM.....	87
5.	Discussão.....	89
6.	Conclusões.....	105
7.	Referências Bibliográficas.....	106
8.	Anexos.....	132
Anexo 1	.....	132
Anexo 2	.....	145
Anexo 3	.....	148

Anexo 4 .....	151
Anexo 5.....	157

## Lista de Figuras

1.1	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	02
1.2	Sistema atual de classificação de <i>Leishmania</i> .....	10
3.1	Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 129.....	38-39
3.2	Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 220.....	39-40
3.3	Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 367.....	40-41
3.4	Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 428.....	41-43
4.1	Extensão dinâmica da detecção de <i>L. (V.) braziliensis</i> para os dois alvos estudados (18S rDNA e HSP70).....	46
4.2	Extensão dinâmica de detecção para RNase P em multiplex com os alvos estudados (18S rDNA e HSP70).....	47
4.3	Gráfico de dispersão de pontos das amostras dos 63 pacientes positivos para o alvo HSP70 (A) e 81 positivos para o alvo 18S rDNA (B).....	54
4.4	Ensaio de concordância de Bland-Altman: avaliação da concordância entre as metodologias de quantificação da carga parasitária de <i>Leishmania</i> , em amostras de escova cervical de pacientes de Rondônia - Brasil, pelos dois alvos estudados (HSP70 e 18S rDNA).....	57
4.5	Perfis das curvas de dissociação e gráfico das diferenças das cepas de referência da CLIOC para o alvo HSP70c.....	59
4.6	Variantes nas quais as espécies de <i>Leishmania</i> ficaram agrupadas com os iniciadores 1 e 2.....	62
4.7	Padrões de referências obtidas para o iniciador 1 e curvas de dissociação alinhadas.....	63
4.8	Padrões de referências obtidas para o iniciador 2 e curvas de dissociação alinhadas.....	63
4.9	Perfis das curvas de dissociação e amplificação da cepa IOCL 3307.....	71

<b>4.10</b>	Perfis das curvas de dissociação e amplificação da cepa IOCL 3310.....	71
<b>4.11</b>	Perfis das curvas de dissociação e amplificação da cepa IOCL 161.....	72
<b>4.12</b>	Perfis das curvas de dissociação e amplificação da cepa IOCL 167.....	72
<b>4.13</b>	Perfis das curvas de dissociação e amplificação da cepa IOCL 1851.....	73
<b>4.14</b>	Curvas de dissociação alinhadas para os alvos COI 220 e 367.....	86
<b>4.15</b>	Algoritmo para a diferenciação de espécies de <i>Leishmania</i> por HRM.....	88

## Lista de Tabelas

3.1	Sequências de iniciadores e sondas utilizados neste estudo.....	31
3.2	Protocolo utilizado nas reações de qPCR.....	32
3.3	Protocolo utilizado para a quantificação absoluta das amostras de pacientes por qPCR.....	33-34
3.4	Combinação de concentrações de DNA e iniciadores testadas para o alvo HSP70.....	36
3.5	Protocolo utilizado para as reações de HRM segundo descrito por Zampieri <i>et al.</i> 2016.....	37
3.6	Protocolo utilizado para a caracterização das amostras clínicas por HRM.....	37
3.7	Concentrações de iniciadores testadas para o alvo COI.....	43
3.8	Protocolo usado para as reações com os iniciadores do alvo COI.....	43
4.1	Concentrações de sondas testadas para qPCR.....	45
4.2	Combinações de concentrações de iniciadores testadas para qPCR.....	45-46
4.3	Valores do ensaio de linearidade para ambos os alvos com <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	46
4.4	Valores do ensaio de linearidade para RNase P em multiplex.....	47
4.5	Resultados dos ensaios de especificidade e sensibilidade.....	48-49
4.6	Cargas parasitárias normalizadas.....	49-52
4.7	Total de amostras positivas e negativas com a mediana e cargas máxima e mínima, mediana da quantidade de DNA humano e seus valores máximos e mínimos.....	53
4.8	Sensibilidade e especificidade da detecção de <i>Leishmania</i> com relação à microscopia óptica, em pacientes de Rondônia, Brasil.....	56
4.9	Sensibilidade e especificidade da detecção de <i>Leishmania</i> com relação à cPCR, em pacientes de Rondônia, Brasil.....	56-57
4.10	Espécies de <i>Leishmania</i> analisadas por HRM com os iniciadores HSP70 c e os padrões observados.....	59
4.11	Resultados dos experimentos para os iniciadores 1 e 2 com as respectivas cepas utilizadas.....	61

<b>4.12</b> Painel de cepas testadas para os iniciadores 1 e 2, e suas respectivas variantes.....	64-67
<b>4.13</b> Polimorfismos encontrados para a região amplificada do iniciador 1 para algumas das cepas submetidas ao HRM.....	69
<b>4.14</b> Polimorfismos encontrados para a região amplificada do iniciador 2 para algumas das cepas submetidas ao HRM.....	70
<b>4.15</b> Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para os iniciadores 1 e 2.....	74
<b>4.16</b> Resultado da validação do HRM com amostras clínicas de pacientes com leishmaniose cutânea, provenientes de Rondônia, Brasil.....	76-84
<b>4.17</b> Iniciadores utilizados para o alvo COI e seus objetivos.....	86

## Lista de quadros

4.1 Diferentes concentrações de DNA de <i>Leishmania</i> e iniciadores testados para o alvo HSP70.....	58
4.2 Concentrações de iniciadores testadas para o alvo COI.....	85

## Lista de Abreviaturas

7SL RNA – Signal Recognition particle RNA

18S rDNA – 18S Ribossomal DNA

BHI-Agar – *Brain Heart Infusion Agar*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator*

CLIOC – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

COI – Citocromo Oxidase I

COLPROT - Coleção de Protozoários (IOC)

Cpb - Cisteína Proteinase b

cPCR – Conventional *Polimerase Chain Reaction*

$C_t$  - *Threshold Cycle*

Cyt B – Citocromo B

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dp – Desvio padrão

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*

G6PD - Glucose-6-phosphate dehydrogenase

gGAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

gyrA – DNA gyrase subunit A.

HIV – *Human immunodeficiency virus*

HRM - *High Resolution Melting Analysis*

HSP70 – *Heat Shock Protein 70*

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ITS 1 – *First Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA*

kDNA – *Kinetoplastid DNA*

LABIMDOE - Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (IOC)

LDA – *Limiting dilution assay*

LM – Leishmaniose Mucosa

LT – Leishmaniose Tegumentar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

MLEE – *Multilocus Enzyme Electrophoresis*

NNN – Meio de cultura Novy-Nicolle-Mc Neal

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de bases

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

qPCR – *Quantitative real-time Polimerase Chain Reaction*

$r^2$  – coeficiente de linearidade

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNAse P - Ribonuclease P

SFB – Soro Fetal Bovino inativado

SSU rRNA – *Small Subunity Ribossomal Ribonucleic Acid*

TE – Tris-EDTA

$T_m$  – *Melting temperature*

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

## 1. Introdução

### 1.1 As leishmanioses

As Leishmanioses são um complexo de doenças negligenciadas e amplamente distribuídas. São endêmicas em mais de 98 países entre a Europa, Ásia, África e as Américas (OMS, 2010). Cerca de 350 milhões de pessoas são susceptíveis à doença que apresenta prevalência global de 12 milhões de casos, com uma incidência anual de 0.2 a 0.4 milhões de casos (Alvar *et al.*, 2012).

A doença é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), que são parasitas intracelulares obrigatórios apresentando alta variabilidade genética e um ciclo de vida heteroxênico, com parte de seu desenvolvimento em hospedeiros intermediários (insetos vetores – flebotomíneos) e parte em hospedeiros definitivos (mamíferos) (Ashford, 1996).

Os parasitos do gênero *Leishmania* podem levar a diferentes formas de infecção, abrangendo infecções assintomáticas e duas formas sintomáticas principais, com padrão clínico que varia de acordo com a espécie do parasito envolvida na infecção. Uma série de fatores do parasito e do hospedeiro, como a espécie ou a forma evolutiva, e as células do sistema imune inato e adaptativo, por exemplo, vão determinar o curso da infecção. A multiplicação parasitária e sua interação com a resposta imune do hospedeiro pode gerar formas de infecção com diferentes graus de gravidade. Estas formas incluem aquelas consideradas severas, onde ocorre a visceralização, levando à Leishmaniose Visceral (LV), e formas que causam desde afecções mucocutâneas desfigurantes até lesões cutâneas leves com cicatrização espontânea, como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A epidemiologia e as características clínicas da doença são altamente variáveis devido à complexidade das interações parasito/vetor/hospedeiro/ambiente (Bailey e Lockwood, 2007).

#### 1.1.1 Ciclo biológico

Os flebotomíneos se infectam ao ingerir as formas amastigotas de *Leishmania*, que possuem flagelo internalizado, durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. Na luz do trato digestivo desses insetos, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas, com flagelo livre, que vivem no

meio extracelular e medem de 15 a 40  $\mu\text{m}$ . Os insetos fêmeas, durante o repasto sanguíneo, inoculam no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp., presentes em suas glândulas salivares (Murray *et al.*, 2005). No hospedeiro vertebrado, os parasitos se diferenciam nas formas amastigotas, medindo de 3 a 6  $\mu\text{m}$ , as quais se dividem obrigatoriamente no interior de células do sistema mononuclear fagocitário - Figura 1.1 - (Garnham, 1987).

No interior dos fagolisossomos dos macrófagos, as amastigotas se multiplicam por divisão binária e infectam outros macrófagos do local ou mesmo de tecidos distantes, após a disseminação do parasito. Em pacientes susceptíveis, esse evento desencadeia um processo inflamatório local ou sistêmico, os quais são ineficazes e a doença é iniciada, se os mecanismos imunes específicos não estiverem devidamente estabelecidos. O estabelecimento da infecção, que culmina na expressão clínica da doença, se desdobra lentamente, após períodos variáveis de incubação, de semanas a meses (Ready, 2014).

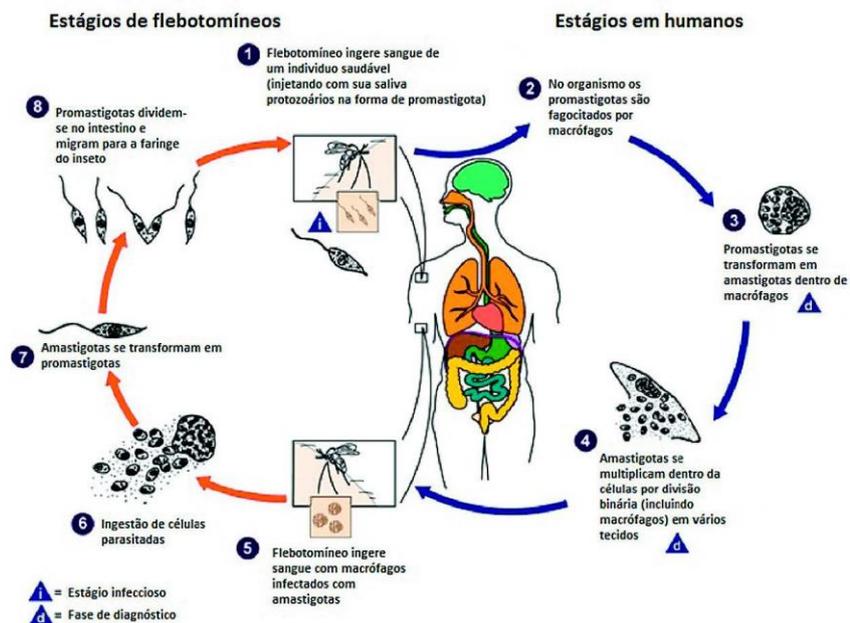


Figura 1.1: Ciclo biológico de *Leishmania* com seus estágios evolutivos no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

## 1.2 O vetor

Os protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos por insetos vetores (flebotomíneos) da ordem Diptera, pertencentes à subfamília *Phlebotominae* e aos gêneros *Lutzomyia*, nas Américas, e *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África (Galati, 1995). No Brasil, os flebotomíneos são chamados popularmente de mosquito-palha, tendo seu comprimento quando adulto variando de 2 a 4 mm. Geralmente possuem hábito crepuscular e conseguem se dispersar por cerca de 200 m (Chaniotis *et al.*, 1974; Marzochi, 1992).

Os flebotomíneos são hospedeiros naturais de diversos microrganismos, incluindo alguns agentes etiológicos de doenças de importância médica, como alguns vírus, bactérias e protozoários. Considerando os tripanossomatídeos, podem ser encontrados três gêneros destes em flebotomíneos: *Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (Lainson e Shaw, 1987).

Existem três gêneros principais de flebotomíneos que ocorrem nas Américas: *Brumptomyia* França e Parrot, 1921, *Warileya* Hertig, 1948 e *Lutzomyia* França, 1924; existindo cerca de 800 espécies de flebotomíneos descritas, sendo que 464 delas estão distribuídas nas Américas (Galati, 2003; Seccombe *et al.*, 1993).

Aproximadamente 166 espécies foram relatadas como vetores comprovados ou potenciais de diferentes espécies de *Leishmania*, tanto nas Américas quanto na Europa, Ásia e África. Entre essas, 78 são espécies de vetores comprovados de *Leishmania* nas Américas, sendo as espécies de *L.* (*Leishmania*), *L.* (*Viannia*) e *Endotrypanum* transmitidas por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. De 118 espécies de *Lutzomyia*, 47 são comprovadas como vetores (Akhoundi *et al.*, 2016). O gênero *Lutzomyia* é o mais diverso dentre os gêneros de flebotomíneos, no entanto, as espécies de vetores de *Leishmania* encontram-se somente em alguns subgêneros (*Nyssomyia*, *Psychodopygus* e *Lutzomyia*). *Lutzomyia* é o gênero mais importante em termos de diversidade de espécies e importância médica, exibindo uma ampla área de dispersão. São encontradas principalmente em áreas de floresta nas Américas do Sul e Central. A classificação das espécies de *Lutzomyia* permanece em grande parte não resolvida e depende de divisões baseadas em caracteres taxonômicos morfológicos que ainda são controversos (Akhoundi *et al.*, 2016).

Uma relação muito próxima tem sido demonstrada entre espécies de flebotomíneos e de *Leishmania*, como por exemplo, entre *Phlebotomus papatasi* e *Leishmania (Leishmania) major*, devido à presença de receptores específicos no intestino médio dos flebotomíneos (Kamhawi *et al.*, 2004). A maioria das espécies de *Leishmania* são mais restritas em relação à variedade de vetores que são capazes de transmiti-las do que em relação à variedade de mamíferos hospedeiros/reservatórios aos quais são capazes de infectar, sugerindo uma relação coevolutiva muito mais próxima com os flebotomíneos do que com seus hospedeiros vertebrados (Ready e Pesson, 1999). No entanto, essa alta especificidade entre *Leishmania* e o seu vetor flebotomíneo parece estar restrita às espécies de vetor do gênero *Phlebotomus* (*P. papatasi* ou *P. duboscqi* e *P. sergenti*). Assim, a ocorrência de híbridos de duas espécies de *Leishmania* pode ter consequências em termos de especificidade e eficiência de transmissão (Volf *et al.*, 2007; Dostálová e Volf, 2012).

As diferentes espécies de *Leishmania* se desenvolvem de formas diferentes nos flebotomíneos vetores, apresentando variações quanto à localização dos parasitos no tubo digestório do inseto (Lainson e Shaw, 1987). Estas características levaram à atual classificação do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Euleishmania* (*L. Leishmania* e *L. Viannia*) e *Sauroleishmania*, que teve sua confirmação bioquímica e molecular posteriormente, apresentando espécies que não são patogênicas ao homem, mas que também são transmitidas por flebotomíneos (Cupolillo *et al.*, 2000).

### 1.3 O Parasito e sua diversidade genética

O gênero *Leishmania* apresenta alta diversidade genética (Cupolillo *et al.*, 1997; Boité *et al.*, 2012). Essa diversidade está associada à ocorrência de variadas formas clínicas. Nas Américas, a forma visceral é causada por *L. (L.) infantum*. Embora ainda possam ser encontradas na literatura a denominação de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum chagasi*, estas são sinônimas de *L. (L.) infantum* (Killick-Kendrick 1985, Rioux *et al.*, 1990). Já a forma tegumentar pode ser causada por 16 espécies diferentes de *Leishmania*, pertencentes aos dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, sendo que no Brasil, as espécies mais comuns causadoras da LTA são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (Baptista *et al.*, 2009; Brasil, 2017). A LTA pode, porém, ser causada

também por outras espécies como *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) shawi*, *L. (V.) utingensis* e *L. (V.) lindenbergi*, principalmente na região Amazônica do país (Grimaldi *et al.*, 1989; Shaw, 1994; Silveira *et al.*, 2002).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam uma ampla variabilidade eco-epidemiológica. As espécies que infectam mamíferos estão distribuídas no mundo todo, estando presentes em áreas tropicais e subtropicais, incluindo as Américas do Norte, Central e do Sul, na bacia do Mediterrâneo, Sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central e Sudeste Asiático, no subcontinente indiano, África e recentemente também tem sido relatada na Austrália (Akhoundi *et al.*, 2016).

Tendo em vista a morfologia bastante similar entre as espécies do gênero *Leishmania*, a classificação clássica destes parasitos foi baseada na infecção em humanos e em caracteres biológicos, geográficos e epidemiológicos (Chance, 1979). Mais recentemente a filogenia molecular têm ajudado a esclarecer a taxonomia dos tripanossomatídeos (Jirkú *et al.*, 2012; Espinosa *et al.*, 2016). No entanto, sua classificação e sua genética evolutiva ainda precisam ser melhor estudadas e abordadas pois uma base taxonômica sólida e consensual, baseada no conhecimento da estrutura populacional e da diversidade filogenética são pré-requisitos indispensáveis para a compreensão da epidemiologia dos microrganismos patogênicos (Bañuls *et al.*, 1999).

O sistema de reprodução de *Leishmania* e suas estruturas populacionais ainda são bastante discutidos. Tibayrenc e colaboradores, ao analisarem resultados publicados em termos de população genética, encontraram um forte desequilíbrio de ligação (associação não-aleatória de alelos em dois ou mais loci, não necessariamente no mesmo cromossoma) em diversas espécies de *Leishmania*, entre elas *L. (L.) infantum*, e propôs então que estes parasitos, dentre outros, são basicamente clonais (Tibayrenc *et al.*, 1990). Essa hipótese não foi rejeitada por Jiménez e colaboradores para populações de *L. (L.) infantum* isoladas de pacientes com Aids (Jiménez *et al.*, 1997).

Em outros estudos, no entanto, esse modelo clonal em *Leishmania* tem sido contestado, como nos estudos realizados por Bastien e colaboradores, e também por Blaineau e colaboradores. Ambos propuseram, após a análise de resultados de eletroforese de campo pulsado, que algumas populações de *L. (L.) infantum* são panmíticas [população em que todos os indivíduos são potenciais

parceiros, ou seja, em que há cruzamentos ao acaso, mantendo-se a frequência dos genótipos] (Bastien *et al.*, 1992; Blaineau *et al.*, 1992).

Em relação à diversidade genética intraespecífica, pode-se dizer que parasitos do gênero *Leishmania* circulam em humanos, vetores e reservatórios como um conjunto de subpopulações heterogêneas (Tibayrenc *et al.*, 1990). Assim, tem sido proposto que alguns clones poderiam se propagar melhor ou pior em áreas endêmicas, e que diferentes graus de endemidade poderiam estar associados a uma maior ou menor diversidade de clones circulando na natureza, representando situações epidemiológicas mais simples ou mais complexas (Pacheco *et al.*, 1986).

Diferentes cenários ecoepidemiológicos também são possíveis influenciadores da variabilidade genética de populações de *Leishmania*. A circulação das populações parasitárias em um maior número de espécies de vetores e reservatórios pode ser possibilitada por situações epidemiológicas mais complexas, em regiões endêmicas. Esse maior número de espécies de vetores e reservatórios representam fontes de heterogeneidade, na dinâmica da interação parasito-hospedeiro (Shaw, 1997).

#### **1.4 Taxonomia e identificação de espécies do gênero *Leishmania***

Os parasitos que causam as leishmanioses apresentam a seguinte classificação taxonômica: pertencem ao reino Protista (Haeckel, 1866), sub-reino Protozoa (Goldfuss, 1817), filo Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963), sub-filo Mastigophora (Desing, 1866), classe Zoomastigophorea (Calkins, 1909), ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976), sub-ordem Trypanosomatina (Kent, 1880), família Trypanosomatidae (Döflein, 1901) e gênero *Leishmania* (Ross, 1903).

A família Trypanosomatidae é caracterizada pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, composta por cadeias de ácido dextrorribonucléico (DNA) em formato de disco, com várias cópias de genoma mitocondrial, localizada no interior de uma mitocôndria única associada à base do flagelo do organismo (Riou e Delain, 1969; Vickerman e Preston, 1976; Simpson *et al.*, 1987; Rodgers *et al.*, 1990).

Estudos taxonômicos de isolados de *Leishmania* provenientes das Américas indicam uma enorme diversidade dentro deste gênero. Um grande

número de novas espécies de *Leishmania* de áreas silvestres neotropicais tem sido descritas. Algumas destas estão relacionadas com a doença em humanos, outras parecem ser restritas a ordens inferiores de mamíferos, como roedores por exemplo (Lainson e Shaw, 1987). Desde então, o número de espécies nomeadas aumentou continuamente e diversos táxons ou regimes de classificação foram propostos (Gardner, 1977; Lainson e Shaw, 1979; Rioux *et al.*, 1990), inclusive uma subdivisão do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com o desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor. Os parasitos do subgênero *Viannia* se desenvolvem no intestino posterior do flebotomíneo, aderidos à parede, enquanto que parasitos do subgênero *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio e anterior do flebotomíneo (Lainson e Shaw, 1987).

As espécies de *Leishmania* são morfologicamente muito similares, com exceções de pequenas diferenças de tamanho. Os critérios iniciais para identificação e caracterização desses parasitos foram baseados em características extrínsecas, como a manifestação clínica, características geográficas e epidemiológicas, além de diversos outros critérios biológicos. No entanto, esses critérios eram muito variáveis, o que levou então ao desenvolvimento de métodos bioquímicos (Cupolillo *et al.*, 1998), imunológicos e moleculares, com o intuito de fornecer marcadores taxonômicos mais precisos, baseados nas características intrínsecas do próprio parasito. Dentre esses métodos, um que é usado até os dias de hoje, sendo considerado ainda o padrão ouro para a tipagem de *Leishmania* pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e pelo Ministério da Saúde (Brasil), é a eletroforese de isoenzimas. Além deste, outros métodos também foram desenvolvidos e utilizados para a identificação de espécies de *Leishmania*, como o uso de anticorpos monoclonais espécie-específicos, ou a utilização de sondas de DNA, e de polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP – do inglês *restriction fragment length polymorphism*), usando como alvo diferentes sequências de DNA (Macedo *et al.*, 1992; Guizani *et al.*, 1994; Mendonza-Leon *et al.*, 1995).

A análise eletroforética de isoenzimas é o método mais utilizado para a caracterização de *Leishmania* (OMS, 1990). Esta metodologia permite a análise de uma grande amostra de genes estruturais fornecendo evidências genéticas para distinguir polimorfismos dentro de uma mesma espécie, bem como para

obter informações sobre a biologia reprodutiva de um determinado organismo (Richardson *et al.*, 1986). Esta técnica envolve a separação de isoenzimas através de eletroforese em gel e a posterior visualização de enzimas específicas usando reações de coloração apropriadas. Isolados identificados por isoenzimas são divididos em grupos com padrões de bandas idênticos (alelos), que são chamados de zimodemas (Godfrey, 1979). Os zimodemas podem representar tanto diferenças enzimáticas simples, quanto um conjunto de diferenças que ocorrem entre grupos populacionais (Momen, 1984).

As espécies de *Leishmania* são classificadas em complexos com base em critérios extrínsecos, como o comportamento do parasito em cultura e em *hamsters* experimentalmente infectados, sendo divididas em três complexos: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana* (Shaw e Lainson, 1972). Por análise de isoenzimas, foram definidos complexos de espécies dentro dos subgêneros (Cupolillo *et al.*, 1994).

Cupolillo e colaboradores propuseram uma nova classificação para o gênero *Leishmania* (Cupolillo *et al.*, 2000). Espécies de *Leishmania* podem ter como hospedeiros vertebrados mamíferos e diversos répteis. Com isso, foi proposta a divisão desses parasitos em duas seções, sendo uma delas dividida em três subgêneros. A primeira seção, chamada de Euleishmania, compreende os três subgêneros: *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)*. Já a segunda seção, chamada de Paraleishmania, compreende diversas espécies de *Leishmania*, inclusive aquelas que sua classificação anterior era considerada incerta, como: *L. herreri*, que foi isolada de preguiças; *L. equatorensis*, descrita como parasita de mamíferos arbóreos, como preguiças e esquilos; *L. deanei* e *L. hertigi*, isoladas de porcos-espinhos; e *L. colombiensis*, que tem sido isolada de diversos hospedeiros, incluindo humanos (Cupolillo *et al.*, 2000).

O subgênero *L. (Sauroleishmania)* inclui somente as espécies que tem os répteis como hospedeiro vertebrado (Taylor *et al.*, 2010<sup>a</sup>). Embora alguns estudos o considerem um outro gênero (Lainson e Shaw, 1987), outros estudos moleculares corroboram sua classificação como subgênero (Saf'janova, 1982). Já as espécies que parasitam mamíferos são divididas em dois subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*.

Um sistema de classificação taxonômica de *Leishmania* foi definido pela aplicação de taxonomia numérica, a partir dos dados obtidos pela eletroforese

de isoenzimas e análise por marcadores moleculares, associadas aos conceitos que foram utilizados para a descrição de cada espécie, e está representado na figura 1.2 (Cupolillo *et al.*, 2014).

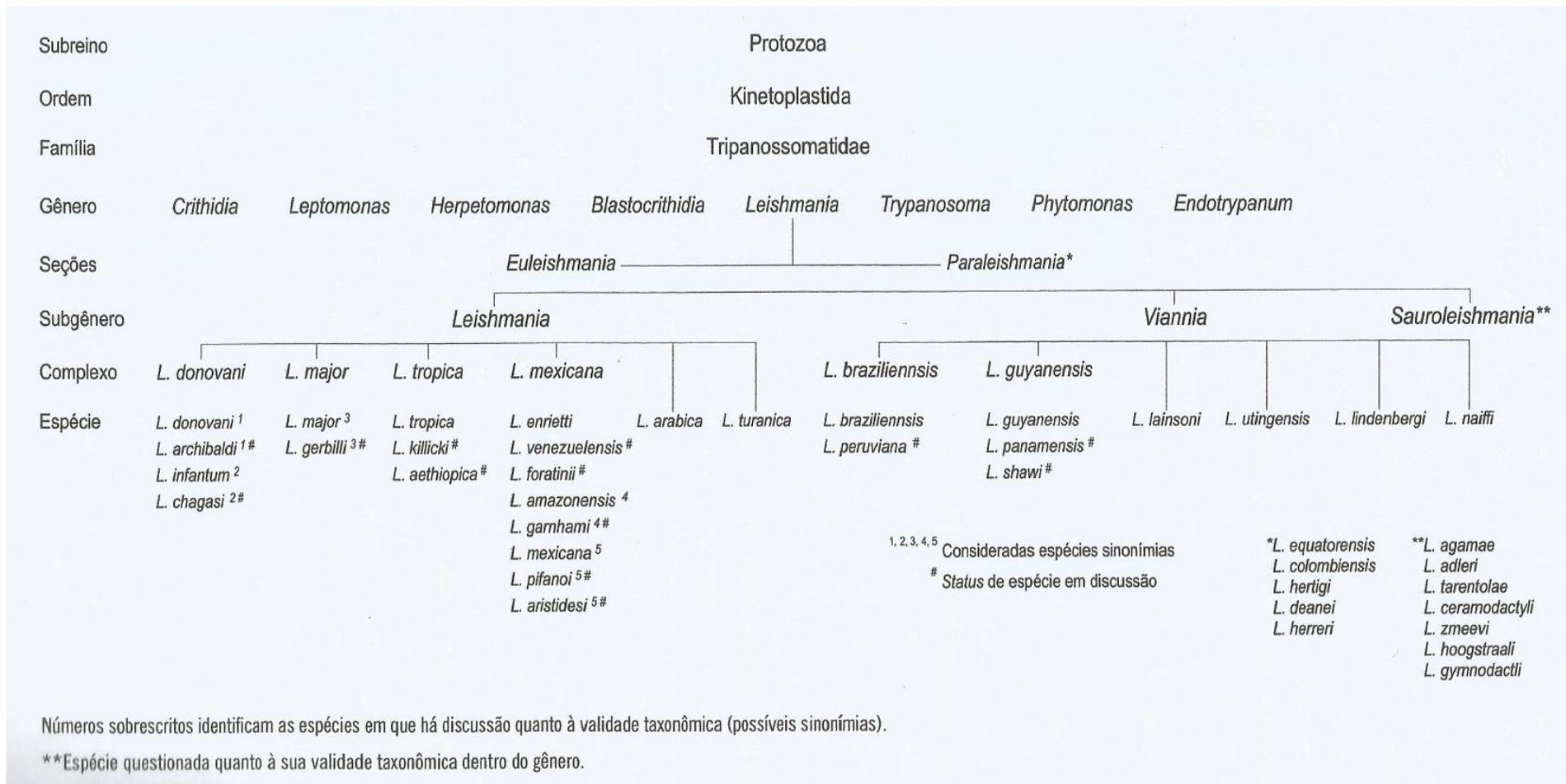


Figura 1.2: Sistema de classificação taxonômica de espécies de *Leishmania*, considerando a descrição original das espécies e classificações propostas com base em critérios extrínsecos e a partir dos resultados obtidos por métodos bioquímicos e moleculares. Retirado do livro *Leishmanioses do Continente Americano*, 2014.

Atualmente são descritas aproximadamente 30 espécies de *Leishmania*, sendo que cerca de 20 dessas são patogênicas para seres humanos. Um fato importante é a diversidade genética inter e intraespecífica que caracteriza o gênero *Leishmania*. Sabe-se que as espécies do subgênero *L. (Viannia)* variam bastante em seu grau de diversidade, pois enquanto *L. (V.) braziliensis*, assim como *L. (V.) naiffi*, apresenta um grau de polimorfismo isoenzimático intraespecífico (compreendendo diversos zimodemas), *L. (V.) guyanensis* é notavelmente homogênea (Cupolillo *et al.*, 2014).

Mais recentemente um estudo realizado por Espinosa e colaboradores propôs uma revisão taxonômica de *Leishmania* e *Endotrypanum*. Este trabalho, através de análises filogenéticas do gene HSP70 e gGAPDH, descreve um novo subgênero dentro de *Leishmania*: *L. (Mundinia)* (Shaw, Camargo e Teixeira, 2016), além dos subgêneros *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)*, ficando o gênero *Leishmania* então dividido em quatro subgêneros. Este novo subgênero foi criado para englobar o complexo *L. enriettii*, formado por uma cepa australiana de *Leishmania* sp., isolada de um canguru vermelho e caracterizada como *L. enriettii*, e também por *L. martiniquensis* (Espinosa *et al.*, 2016).

### 1.5 Aspectos Epidemiológicos

As leishmanioses podem ser agrupadas em duas grandes categorias de acordo com a fonte de infecção: as leishmanioses zoonóticas, nas quais os hospedeiros reservatórios são animais, domésticos ou silvestres, e as leishmanioses antroponóticas, nas quais o hospedeiro reservatório é o humano (OMS, 2017). Embora cada espécie de *Leishmania* seja geralmente classificada em uma ou outra categoria, podem haver algumas exceções. Por exemplo, *L. (L.) tropica*, que é o agente etiológico de algumas leishmanioses cutâneas na Europa, Ásia e África, é normalmente antroponótica, no entanto, em alguns focos da doença, este parasito deriva não de seres humanos, mas de outros animais. Da mesma forma, várias espécies que causam leishmaniose cutânea e são tipicamente zoonóticas, eventualmente podem ter os seres humanos como fonte ocasional de infecção (OMS, 2010).

Na Europa, Ásia e África, os principais focos de transmissão de *Leishmania* ocorrem nos peridomicílios, em áreas semiáridas que sofreram

modificações por seres humanos, enquanto que nas Américas, os parasitos são frequentemente associados a habitats silvestres, embora algumas espécies apresentem transmissão predominantemente peridomiciliar. Esses parasitos habitam o intestino do inseto vetor, no entanto, alguns parasitos do gênero *Leishmania* já foram encontrados em glândulas salivares de flebotomíneos vetores. A presença de uma grande quantidade de parasitos em sua forma metacíclica nas glândulas salivares foi correlacionada à intensidade da infecção no intestino do inseto vetor (Killick-Kendrick *et al.*, 1996).

O sistema ecológico das espécies de *Leishmania* é composto por uma ou um pequeno número de espécies de flebotomíneos vetores e uma ou poucas espécies do hospedeiro reservatório vertebrado. Normalmente existe um hospedeiro reservatório principal para uma determinada espécie de *Leishmania* em um determinado foco, mas outros mamíferos na mesma área podem ser infectados. Estes são hospedeiros secundários e acidentais. Os hospedeiros secundários podem desempenhar algum papel na manutenção da transmissão do parasito, e, por isso, podem eventualmente trazer o parasito do seu foco enzoótico para o contato próximo com humanos. Já os hospedeiros acidentais são mamíferos que, apesar de infectados, não desempenham nenhum papel na manutenção da transmissão, ou seja, não são capazes de transmitir o parasito (Rey, 2013).

A LTA é a forma mais branda da doença, compreendendo a ocorrência de lesões locais na pele, no local de inoculação do parasito pelo flebotomíneo vetor. Nessa forma clínica, são frequentes as ulcerações da pele, com bordas elevadas, e o quadro é normalmente assintomático, sendo predominante em áreas corporais expostas. Atinge os indivíduos que habitam ou que estiveram em áreas endêmicas (Furtado, 1994; Gontijo e Carvalho, 2003). Em alguns casos, lesões inicialmente cutâneas, normalmente causadas por *L. (V.) braziliensis*, podem acometer as mucosas do paciente, evoluindo assim para a forma mucosa da doença. Alguns fatores podem estar associados a essa evolução da forma clínica, como por exemplo a demora na cicatrização da lesão primária e o tratamento inicial inadequado (Marsden, 1986; OMS, 1990; Carvalho *et al.*, 1995).

Além disso, na LT pode ocorrer a forma cutânea difusa da doença, que apresenta lesões nodulares e infiltrações cutâneas pronunciadas e que podem

ser facilmente confundidas com lesões presentes na hanseníase (Pearson e Sousa, 1996; Grevelink e Lerner, 1996). A forma disseminada é caracterizada por lesões múltiplas, normalmente ulceradas, distribuídas por diversas áreas da pele, distantes do sítio de inoculação primária (Marzochi e Marzochi, 1994). Os diferentes tipos de lesões presentes na forma tegumentar da doença podem ser facilmente confundidos com úlceras traumáticas, úlceras de estase, úlcera tropical, úlceras de membros inferiores causadas por anemia falciforme, piodermites, paracoccidiodomicose, neoplasias cutâneas, sífilis e tuberculose cutânea. Por isso, somente o diagnóstico clínico não é suficiente para a identificação precisa de infecções por *Leishmania* (Montenegro, 1926; Furtado, 1994).

No Brasil, recentemente tem sido relatadas epidemias urbanas da forma visceral da leishmaniose (LV) em diversas áreas. Frequentemente também tem sido detectado o parasito em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), semelhantemente ao que é observado no sul da Europa (OMS, 2010; Brasil, 2011). Um dos principais fatores que contribuem para o aumento da mortalidade de pacientes com LV é o diagnóstico tardio, pois os sintomas são facilmente confundidos com os de outras doenças. Esse fator acaba colocando os pacientes em risco, uma vez que há o rápido acometimento sistêmico, levando então a uma alta letalidade (Brasil, 2006).

Ainda assim, alguns estudos demonstram que parte da população de áreas endêmicas, algumas vezes permanecem assintomáticos ou se recuperam espontaneamente da infecção. Com isso, dentre os principais fatores de risco associados à progressão da LV estão a desnutrição, fatores genéticos e a coexistência de outras doenças (Brasil, 2011; Griensven e Diro, 2012).

## **1.6 Diagnóstico**

Normalmente, o diagnóstico das leishmanioses compreende a associação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Entretanto, os sinais clínicos e os sintomas, por si só ou em combinação, não são sempre suficientes, visto que podem ser confundidos com outras doenças (OMS, 2010), sendo portanto fundamental a realização do diagnóstico laboratorial, que pode ser feito por exames parasitológicos, imunológicos, testes sorológicos e exames moleculares.

O diagnóstico clínico da LTA é realizado com base nas características da lesão, associadas aos dados epidemiológicos do paciente. As manifestações clínicas dessa forma da doença dependem de diversos fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e sua relação com o hospedeiro (Saravia *et al.*, 1989). Considerando o amplo espectro de lesões envolvidas na LTA, realiza-se a confirmação do diagnóstico clínico, que é feita pelo diagnóstico parasitológico através da pesquisa do parasito na amostra.

Devido à sua alta especificidade, o método ouro para o diagnóstico da LTA ainda é a microscopia (Herwaldt, 1999), no qual é feita a análise microscópica do material clínico, que pode ser obtido por escarificação, aspiração, biópsia da borda da lesão ou por métodos menos invasivos como a escova cervical, para a busca das formas amastigotas do parasito no material fixado em lâminas coradas. Contudo, nem sempre é possível a visualização dos parasitos diretamente no material, pois o tempo de duração da lesão e o método de coleta podem influenciar na sensibilidade da detecção dos parasitos pelo exame microscópico (Gontijo e Carvalho, 2003; OMS, 2010).

Com isso, muitas vezes tenta-se isolar o parasito, cultivando-o em meio de cultura para a posterior análise e identificação da espécie envolvida por ensaios moleculares, como de isoenzimas. Isso é feito porque a correta identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas em uma infecção, assim como daquelas circulantes em áreas endêmicas, é de fundamental importância para determinar o prognóstico e tratamento corretos, e também para o estudo da epidemiologia da doença e o planejamento de estratégias de controle (Bañuls *et al.*, 2007). No entanto, este método exige facilidades laboratoriais e pessoal treinado para a realização das técnicas, além de demandar tempo e recursos (Herwaldt, 1999).

Os primeiros testes de imunodiagnóstico não apresentavam boa sensibilidade e especificidade, e foram então substituídos, nos anos 1970, pela imunofluorescência indireta e pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* – ELISA). Estes, por sua vez, foram substituídos no campo por duas técnicas que não requerem laboratório: a aglutinação direta de promastigotas, na década de 1980, e a detecção imunocromatográfica por dip-stick de um antígeno K39 recombinante, clonado em meados dos anos 90. (OMS, 2010).

Os testes de aglutinação direta à base de antígenos liofilizados e os testes de imunocromatografia comercialmente disponíveis tornaram-se testes de referência, pois apresentam elevadas sensibilidade e especificidade (Chappuis *et al.*, 2006), são de fácil uso e exigem mínimas expertise tecnológica e estrutura de laboratório. No entanto, esses métodos podem apresentar resultados imprecisos em hospedeiros imunossuprimidos, além de não identificarem as espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção.

Considerando o diagnóstico da LTA, os testes sorológicos são raramente utilizados, uma vez que a sensibilidade pode ser variável, pois os níveis de anticorpos circulantes contra os parasitos que causam essa forma da doença tendem a ser reduzidos; além de demonstrar variação quanto à especificidade, principalmente em áreas onde há prevalência de outros parasitas antigenicamente semelhantes, levando à ocorrência de reações cruzadas (Kar, 1995).

O teste de Montenegro era muito utilizado para o diagnóstico da LTA devido ao seu uso simples e por sua alta sensibilidade e especificidade (Weigle *et al.*, 1991). No entanto, entre suas principais desvantagens estão a necessidade da cultura para a produção do antígeno do teste de Montenegro, o fato de que diferentes preparações de antígenos influenciam na sensibilidade do teste, e o mesmo não permitir a distinção entre infecções passadas e presentes (Gontijo e Carvalho, 2003). Este teste não é utilizado para o diagnóstico da leishmaniose visceral, uma vez que os pacientes só desenvolvem forte imunidade mediada por células específicas contra *Leishmania*, quando curados (Bensoussan *et al.*, 2006).

Neste cenário, as ferramentas de biologia molecular utilizadas como métodos de diagnóstico buscam associar a alta sensibilidade para a detecção dos parasitos aliada à elevada especificidade para a acurada identificação do agente etiológico (Bensoussan *et al.*, 2006; Schönian, 2010; Graça *et al.*, 2012; Koltas *et al.*, 2016).

Nos anos 1990, a detecção de DNA do cinetoplasto pela reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction – PCR*) convencional (cPCR), aumentou significativamente a sensibilidade e permitiu o diagnóstico de espécies em amostras de tecido e sangue. Vários protocolos baseados em PCR para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. têm sido

desenvolvidos e utilizados por pesquisadores e profissionais de saúde (Reithinger e Dujardin, 2007).

### 1.6.1 A qPCR no diagnóstico de *Leishmania*

A PCR quantitativa em tempo real (do inglês - *quantitative real-time PCR*), ou qPCR, é uma tecnologia que possibilita com excelência o diagnóstico molecular, com sua capacidade de detectar e quantificar quantidades mínimas de ácidos nucleicos em uma vasta gama de amostras de diferentes origens (Bustin, 2000; Kubista *et al.*, 2006). A simplicidade conceitual e prática deste método, juntamente com sua combinação de rapidez, sensibilidade e especificidade em um ensaio homogêneo, o tornaram o mais utilizado atualmente para a quantificação de ácidos nucleicos. Além de seu uso como ferramenta de pesquisa, têm sido desenvolvidas várias aplicações diagnósticas, incluindo a quantificação de parasitas, determinação da dosagem de genes, identificação de transgenes em alimentos geneticamente modificados, avaliação do risco de recorrência de câncer e aplicações para uso forense (Bernard *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2004; Bustin *et al.*, 2005; Bustin *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2007).

Em *Leishmania*, a avaliação quantitativa da carga parasitária em tecidos do hospedeiro tem sido proposta como muito útil para o monitoramento da resposta à terapia antileishmania, e para abordar as lacunas na compreensão da história natural da infecção por *Leishmania* em humanos (Mary *et al.*, 2006; Meide *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2010).

O método mais tradicional utilizado em estudos científicos, para a quantificação de *Leishmania* em tecidos de hospedeiros, é o ensaio de diluição limitante (LDA – do inglês *limiting dilution assay*) (Maurya *et al.*, 2010; Titus *et al.*, 1985). No entanto, esta metodologia é árdua, bastante demorada, depende de condições estéreis e pessoal altamente treinado, além de poder ser aplicada somente com amostras frescas e que possuam cargas parasitárias relativamente altas, devido à sua baixa sensibilidade (Maurya *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006).

Atualmente, a qPCR é amplamente utilizada em estudos para o desenvolvimento de metodologias diagnósticas, uma vez que permite uma detecção e quantificação de parasitos de forma rápida, sensível e precisa (Cummings e Tarleton, 2003; Lin *et al.*, 2000; Kamau *et al.*, 2011).

O estabelecimento de ensaios quantitativos baseados na qPCR possibilitou estimar a carga parasitária de *Leishmania* diretamente de amostras de pacientes. O uso da qPCR tem sido de extrema importância para o monitoramento da progressão da doença, da eficácia do tratamento anti-*Leishmania*, o manejo clínico de pacientes co-infectados com HIV (Bossolasco *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2013) e daqueles curados de leishmaniose cutânea, mas com risco de desenvolver leishmaniose mucosa (Jara *et al.*, 2013). Para isso, diversos protocolos de qPCR em tempo real têm sido desenvolvidos, demonstrando uma alta sensibilidade analítica e uma excelente linearidade (Mary *et al.*, 2004; Castilho *et al.*, 2008).

Estudos relatando o uso de qPCR vinham focando principalmente na LV, enquanto estudos reportando LTA, para as espécies de *L. (Viannia)* eram mais escassos (Mary *et al.*, 2004; Verna *et al.*, 2010; Sudarshan *et al.*, 2011). Nos últimos anos, ensaios de qPCR para detecção de *Leishmania*, quantificação e identificação de espécies aprimoraram a análise e o diagnóstico molecular da LTA (revisto por Moreira *et al.*, 2017). Contudo, sua maior sensibilidade analítica em relação à PCR convencional foi questionada (Bastien, 2008). Ainda assim, o número de estudos reportando ensaios de qPCR aumenta a cada ano, destacando as vantagens desta técnica, como a velocidade de obtenção de resultados, a ampla faixa dinâmica para quantificar alvos de DNA e redução de contaminação cruzada, uma vez que não há necessidade de manipulação dos produtos de PCR para realizar a eletroforese em gel (Moreira *et al.*, 2017; Galluzzi *et al.*, 2018).

As técnicas baseadas em PCR também possibilitam a identificação de espécies de *Leishmania*, o que é extremamente útil para o manejo clínico de pacientes com leishmaniose, pois sabe-se que as diferentes espécies estão relacionadas à gravidade da doença e ao resultado do tratamento (Murray *et al.*, 2005). Algumas dessas técnicas são bastante utilizadas, como o PCR-RFLP para os genes HSP70 em *Leishmania* (Garcia *et al.*, 2005). Alguns estudos relataram o uso de técnicas de análise da curva de dissociação do DNA, como o HRM (do inglês - *High Resolution Melting Analysis* – HRM) [Talmi-Frank *et al.*, 2010; Ceccarelli *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2014].

Recentemente foi validado um método de qPCR como um consenso para a quantificação de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes com doença de

Chagas (Ramírez *et al.*, 2015). No estudo de revisão de Moreira e colaboradores (2017) foi também evidenciada a necessidade de uma proposta de consenso para a quantificação da carga parasitária de *Leishmania* em amostras de pacientes com LTA.

### **1.6.2 Principais marcadores utilizados em *Leishmania* para identificação de espécies**

Os marcadores comumente utilizados para diagnóstico e estudos de filogenia molecular para os tripanosomatídeos são direcionados a diversas regiões do gene ribossômico, como o SSU rRNA e sequências espaçadoras intergênicas, gGAPDH, "*spliced leader*", genes mitocondriais como Citocromo B, Citocromo Oxidase e as regiões conservadas dos minicírculos do kDNA; além de genes nucleares, como a região variável do gene hsp70 e sequências satélites nucleares (Souto *et al.*, 1999; Noyes *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2004; Deborggraeve *et al.*, 2008).

Devido ao elevado número de cópias de minicírculos por célula, o kDNA é o alvo mais comumente utilizado para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. (Volpini *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2008; Ampuero *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2009; Roque *et al.*, 2010). São propostos vários iniciadores que amplificam regiões do kDNA, porém a maioria desses marcadores, são direcionados à região conservada dos minicírculos e comum a todas as espécies do gênero, não sendo capazes de identificar variabilidade interespecífica. Embora a análise de polimorfismos a partir de fragmentos de restrição do kDNA apresente variabilidade para diferenciar entre gêneros e subgêneros, e alguns complexos, sua capacidade discriminatória, através da PCR RFLP, foi descrita apenas para algumas espécies do gênero, como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* (Pacheco *et al.*, 2000; Volpini *et al.*, 2004).

O gene mitocondrial, Citocromo b (Cyt b), está envolvido nos processos de transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. É um gene conservado, de cópia única, localizado nas moléculas dos maxicírculos do kDNA e bastante utilizado para a caracterização de isolados do gênero *Leishmania* (Luyo-Acero *et al.*, 2004). Embora os ensaios moleculares direcionados para Cyt b tenham essa capacidade discriminatória em diferenciar as espécies de ambos

os subgêneros, a sensibilidade desse marcador é muito menor frente à sensibilidade analítica e diagnóstica da PCR para o kDNA (Lopes *et al.*, 2016).

Dentre os alvos nucleares que resultam em produtos de PCR com variação interespecífica nas sequências de DNA, estão aqueles direcionados para as sequências repetitivas de DNA nuclear, para os genes codificantes da glicoproteína 63 (gp63) e da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), para o gene de mini éxon e os espaçadores internos transcritos (ITS) 1 do rDNA, além do gene codificante para as proteínas de choque térmico (hsp) e do gene 7SL RNA (Victoir *et al.*, 1998; Castilho *et al.*, 2003; Schönian *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2005; Fraga *et al.*, 2010).

O gene codificante para a proteína de superfície gp63, encontrada em todo o gênero *Leishmania*, é bastante utilizado na Europa, Ásia e África, com elevada capacidade discriminatória entre as espécies do complexo *L. (L.) donovani*, além de ter sido utilizado para o diagnóstico de *L. (L.) infantum* nas Américas (Mauricio *et al.*, 2000; Dujardim *et al.*, 2002).

O gene do mini exon está envolvido no processo de trans-splicing em todos os tripanosomatídeos. São genes nucleares multicópias que se repetem *in tandem* mais de cem vezes no genoma, onde cada cópia contém tanto uma região transcrita conservada quanto uma região variável não transcrita, a qual consegue diferenciar os três grandes complexos do gênero: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) donovani*, em relação a tamanho e sequência desta região (Fernandes *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1998).

A região ITS1 do rDNA está entre as mais utilizadas para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* na Europa, Ásia e África, e, embora a PCR-RFLP com a enzima de restrição *HaeIII* possibilite a distinção entre algumas espécies que ocorrem nas Américas, seu perfil discriminatório não é capaz de diferenciar entre todas as espécies do subgênero *L. Viannia* (Cupolillo *et al.*, 1995; Schönian *et al.*, 2003, 2010; Tomás-Pérez e Riera, 2013).

Embora eficazes, a maioria dos métodos descritos apresenta limitações em seus perfis discriminatórios e/ou necessitam de associação de técnicas, como a combinação de vários iniciadores e o fracionamento do DNA por enzimas de restrição, não existindo até então, um algoritmo molecular reprodutível e eficaz para a caracterização de *Leishmania* spp., principalmente aquelas do subgênero *L. (Viannia)*, que são as mais dispersas no país.

A região 18S rDNA, parte da menor subunidade ribossômica em eucariotos (SSU), é comumente utilizada para o diagnóstico de diferentes espécies de *Leishmania*, devido à sua natureza altamente conservada entre os tripanossomatídeos. Este gene apresenta um grande número de cópias no genoma e, por isso, alguns estudos mostraram que a amplificação desta região representa um sistema altamente sensível de detecção de *Leishmania* (Guillaume *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 2014), sendo muito utilizado também para a determinação da carga parasitária por *Leishmania* (Bezerra-Vasconcelos *et al.*, 2011; León *et al.*, 2017).

Entre os alvos já mencionados para a identificação específica de *Leishmania*, o gene codificante para as proteínas de choque térmico tem se mostrado bastante útil para a identificação de uma ampla gama de espécies de diversas origens geográficas (Zampieri *et al.*, 2016). Essas proteínas (hsp70) atuam como componentes de vias celulares relacionadas com chaperonas moleculares e dobramento de proteínas envolvidas em processos decorrentes de danos provocados por calor (Bukau & Horwich, 1998; Lindquist & Craig, 1988). O gene *hsp70* possui regiões conservadas e polimórficas, e seus polimorfismos permitiram que Graça e colaboradores desenvolvessem iniciadores que se anelam flanqueando a região polimórfica desse gene, de 234 pares de bases (pb), sendo capazes de diferenciar as principais espécies de *Leishmania* que circulam em território nacional, incluindo espécies do subgênero *L. (Viannia)* (Graça *et al.*, 2012).

### **1.6.3 O uso de metodologias baseadas em qPCR e análise da curva de dissociação na identificação de espécies de *Leishmania***

Os métodos para a detecção de DNA por qPCR são divididos em dois grupos, de acordo com o agente fluorescente utilizado e a especificidade da reação, podendo estes ser agentes intercalantes de DNA dupla fita, como o SYBR Green, ou fluoróforos ligados a oligonucleotídeos (sondas) que detectam apenas produtos específicos da amplificação por PCR, como o sistema TaqMan e as sondas LightCycler (Navarro *et al.*, 2015).

Quando o SYBR Green se liga à alça menor do DNA dupla fita, sua fluorescência é aumentada e medida durante a fase de extensão de cada ciclo da reação de qPCR (Wittwer *et al.*, 1997, Morrison *et al.*, 1998). Devido à

potencial geração de produtos inespecíficos e formação de dímeros de iniciadores, uma etapa de análise da curva de dissociação pós-PCR é necessária para verificar a especificidade da reação, uma vez que produtos de PCR de tamanhos e conteúdos CG diferentes apresentam picos diferentes nas curvas derivativas de dissociação, o que corresponde a diferentes temperaturas de dissociação, ou temperatura de “*melting*” – T<sub>m</sub> (Ririe *et al.*, 1997).

A propriedade de diferenciação dos produtos de PCR em reações utilizando SYBR Green, através da análise das curvas de dissociação tem sido amplamente explorada para a tipagem de patógenos como *Cryptosporidium parvum* (Tanriverdi *et al.*, 2002), *Giardia duodenalis* (Amar *et al.*, 2003), e alguns vírus como o papilomavírus humano (Moreau *et al.*, 2013) e influenza B (Wong *et al.*, 2014).

Em 2002, Nicolas e colaboradores desenvolveram um ensaio de PCR, utilizando o sistema LightCycler e iniciadores que amplificam a região mais longa e variável dos minicírculos de DNA do cinetoplasto, para detectar e diferenciar quatro das espécies de *Leishmania* de maior importância médica que ocorrem na Europa, Ásia e África, através da análise da curva de dissociação dos produtos amplificados. Com esse ensaio foi possível diferenciar, através da temperatura de dissociação, *L. (L.) major* de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) infantum* (Nicolas *et al.*, 2002).

Em 2005, um estudo realizado por Quispe-Tintaya e colaboradores descreveu um ensaio fluorogênico para a identificação de espécies e grupos intraespecíficos dentro do complexo *L. (L.) donovani*. A diferenciação das espécies foi feita usando a cisteína proteinase b (*cpb*) como alvo, através da combinação de duas etapas: uma reação de qPCR com a utilização de sondas LightCycler™, amplificando dois isogênes de *cpb*, e uma transferência de energia por ressonância de fluorescência/análise da curva de dissociação (FRET/MCA) de uma região comum aos dois isogênes de *cpb* estudados. Esta metodologia foi aplicada em 26 cepas de *Leishmania* e, posteriormente, em 13 isolados de pacientes. Através da combinação das duas etapas, foi possível distinguir todas as cepas do complexo *L. (L.) donovani* de *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) aethiopica*, sendo possível também identificar cinco grupos distintos dentro do complexo *L. (L.) donovani* (Quispe-Tintaya *et al.*, 2005).

Em 2012, Pita-Pereira e colaboradores usaram iniciadores amplificando uma região conservada do kDNA, de 120 pb, em uma reação de qPCR utilizando SYBR Green, que foram capazes de diferenciar os dois subgêneros de *Leishmania* [*L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*] por uma diferença de 1.6°C na média da T<sub>m</sub> das curvas derivadas da amplificação desses dois subgêneros. Esse ensaio foi validado com 30 amostras clínicas de pacientes com leishmaniose visceral ou cutânea, e amostras de *Lutzomyia* spp. naturalmente infectados capturados em duas localidades brasileiras. Para a região amplificada dos minicírculos de kDNA, as espécies do subgênero *L. (Viannia)* analisadas [*L. (V.) shawi* e *L. (V.) braziliensis*] revelaram um conteúdo inferior de G/C (43,6%) comparadas às cepas do subgênero *L. (Leishmania)* [*L. (L.) infantum* - 48.1% - e *L. (L.) amazonensis* - 48.7%], o que poderia explicar as menores temperaturas de dissociação obtidas para *L. (Viannia)* (77.34°C ± 0.01) (Pita-Pereira *et al.*, 2012).

Considerando os resultados apresentados, esses métodos moleculares muitas vezes não permitem a diferenciação dos parasitos e identificação da espécie envolvida (Schulz *et al.*, 2003; Bell e Ranford-Cartwright, 2002). Nesse sentido, essas metodologias têm sido constantemente aprimoradas, como o desenvolvimento da análise de alta resolução das curvas de dissociação do DNA.

A análise de curvas de dissociação de alta resolução (HRM – do inglês *high resolution melting analysis*) é uma técnica de biologia molecular para detecção de mutações, polimorfismos e diferenças epigenéticas em amostras de DNA. Funciona como um método rápido de genotipagem de variantes conhecidas ou para a varredura de variantes desconhecidas. Foi desenvolvida pela Idaho Technology, Inc (Salt Lake City, UT, EUA) e pela Universidade de Utah - EUA, e introduzido no mercado em 2002 (Reed *et al.*, 2007).

Na reação de HRM um fluoróforo intercalante de DNA de dupla fita é adicionado na PCR antes da reação de amplificação. Após a amplificação do DNA, a amostra é aquecida ao longo de um gradiente de temperatura ao mesmo tempo em que a fluorescência é continuamente coletada. Esse processo gera uma curva de dissociação. De acordo com o aumento da temperatura, a fluorescência decresce, refletindo a desnaturação do DNA em fitas simples. A T<sub>m</sub> da amostra pode ser obtida a partir da curva de dissociação, sendo definida

como a temperatura em que 50% de cada molécula de DNA está desnaturada (Reed *et al.*, 2007). A análise do HRM é baseada na diferença entre a forma das curvas de dissociação e na diferença entre os valores de  $T_m$  das amostras, sendo que a forma da curva é mais informativa, uma vez que é utilizada como indicador da presença de heterodúpliques formados a partir de DNA heterozigoto (Graham *et al.*, 2005).

Os ensaios de HRM foram possibilitados pela nova geração de corantes saturantes da dupla fita de DNA, como o Eva Green ou SYTO9, juntamente com o desenvolvimento de softwares específicos para a análise de HRM, sejam em equipamentos próprios para o desenvolvimento de reações de HRM, ou em equipamentos adaptados para reações de PCR em tempo real. Esses instrumentos, como o Viia 7 e o QuantStudio (Applied Biosystems), ou o Rotor-Gene 6000 (Corbett), são capazes de monitorar o decaimento de fluorescência a uma taxa de  $0,017^\circ\text{C/s}$ , produzindo dez pontos de leitura por  $^\circ\text{C}$  (Moreira *et al.*, 2017).

Em 2010, Kiehl realizou um estudo para investigar variantes de sequência em 11 regiões do gene *CFTR* em amostras de pacientes com fibrose cística, através da análise de HRM (Kiehl, 2010). Um outro estudo realizado por Campioni e colaboradores utilizou esta metodologia para avaliar a resistência de *Salmonella enteritidis* a quinolonas através da verificação de mutações no gene *gyrA* (Campioni, 2013).

Mais recentemente, estudos clínicos que utilizaram a análise por HRM descrevem que esta técnica é altamente sensível e capaz de detectar pequenas alterações de sequência em diferentes regiões de vários genes, sendo portanto capaz de diferenciar sequências que apresentam alta identidade, auxiliando dessa forma a busca de mutações em genes de importância médica e a identificação molecular de espécies (Ashtiani *et al.*, 2017; Edwards *et al.*, 2018).

Em *Leishmania*, um estudo realizado por Ceccarelli e colaboradores avaliou a possibilidade de diferenciar os dois subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* aplicando a análise da curva de dissociação em amostras de sangue periférico e de swabs conjuntivais de cães, obtendo resultados promissores e propondo então que métodos de análise da curva de dissociação sejam estudados e possivelmente utilizados para o diagnóstico molecular e identificação de espécies de patógenos (Ceccarelli *et al.*, 2014). Neste mesmo

estudo, foram analisadas sete cepas de *Leishmania*, sendo quatro do subgênero *L. (Leishmania)* e três do subgênero *L. (Viannia)*. Os resultados foram positivos quando associados com os dados do qPCR. Somente a análise de HRM apresentou uma pequena diferença entre os dois subgêneros, no entanto não foram obtidas diferenças significativas nos valores de T<sub>m</sub>. Os dados corroboraram com estudos prévios na literatura. As análises de HRM foram realizadas em amostras de parasitos isolados de cães infectados na Argentina (Ceccarelli *et al.*, 2014).

Aghaei Afshar e colaboradores detectaram uma infecção natural por *L. (L.) tropica* em uma espécie de flebotomíneo, *Phlebotomus sergenti*, ao analisar amostras de diferentes espécies de flebotomíneos por HRM. Com isso, afirmam em seu estudo, que a utilização do HRM para a identificação de espécies de *Leishmania* é simples, rápida, sensível, específica e pode ser usada para diagnosticar o parasito diretamente a partir do vetor, com um mínimo de manipulação e interpretação do operador após a PCR (Aghaei Afshar *et al.*, 2014).

Também em 2014, Hernández e colaboradores padronizaram ensaios de HRM, tendo como alvos o ITS1 e o HSP70, com o objetivo de identificar espécies de *Leishmania*. Para isso foram desenhados pares de iniciadores específicos que, quando aplicados a um conjunto de cepas bem caracterizadas pelo padrão-ouro (PCR-RFLP/MLEE), e juntamente com a análise de HRM, permitiram a identificação de seis espécies de *Leishmania* das Américas (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, pela comparação com cepas de referência. Esse estudo foi validado com 35 amostras de parasitos isolados de pacientes, insetos vetores e mamíferos, com um limite de detecção correspondente a 10 parasitos/mL (Hernández *et al.*, 2014).

Zampieri e colaboradores desenvolveram um ensaio tendo como alvos duas regiões do gene HSP70 de *Leishmania*, ambas dentro de uma região de 234 pb, já descrita para a identificação de espécies (Graça *et al.*, 2012): uma delas mais conservada de 144 pb, amplificada em todas as espécies de *Leishmania*, e outra região menor e mais variável, de 104 pb, amplificada somente para espécies do subgênero *L. (Viannia)*. Baseado na análise de HRM, estes ensaios diferenciaram oito espécies de *Leishmania* encontradas nas

Américas: *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*; e três espécies encontradas na Europa, Ásia e África: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major*. Esse ensaio foi validado com 16 amostras de tecido de *hamster* dourado experimentalmente infectados, cepas de parasitos isolados de amostras humanas, amostras de tecido fresco humano ou embebidos em parafina, tecidos de camundongos BALB/c experimentalmente infectados e amostras de flebotomíneos naturalmente infectados. Os resultados das análises de HRM foram comparados com a genotipagem prévia obtida por sequenciamento do alvo 18S rDNA ou PCR do alvo G6PD, apresentando uma alta correlação entre as metodologias. Por fim, foi proposto um algoritmo que permite identificar, por HRM, as principais espécies de *Leishmania* circulantes no Brasil (Zampieri *et al.*, 2016).

Técnicas como a qPCR e análise de curvas de dissociação permitem uma alta sensibilidade e especificidade (de até 100%) na detecção de *Leishmania*, independente da espécie ou gênero, o que torna a aplicação do método necessária para o diagnóstico diferencial antes do início do tratamento. Vários trabalhos demonstram o melhor desempenho da PCR frente à microscopia e o isolamento e cultivo do parasito, especialmente em amostras com baixa carga parasitária (Garcia *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2002; Strauss-Ayali *et al.*, 2004). No entanto, a maioria desses trabalhos não testou um painel de cepas que representasse a diversidade inter e, principalmente, intraespecífica que ocorre em *Leishmania*. Há também a necessidade de testar os métodos em amostras clínicas e de realizar a padronização desses métodos. Com isso, um estudo que incluía validação analítica, definindo todos os parâmetros de uma reação de qPCR para uma padronização apropriada, e que possibilite a obtenção da carga parasitária em paralelo à identificação de espécies para associação desses dados, ainda se faz necessário.

Diante desses fatos, ainda há a necessidade de mais estudos a respeito de metodologias moleculares capazes de detectar, quantificar e identificar espécies de *Leishmania*, verificando a sua aplicação em uma maior variedade de amostras que representem a variedade intraespecífica de *Leishmania*. A análise de amostras provenientes de diferentes materiais, avaliando, dessa

forma, sua utilização como um método de diagnóstico molecular para a leishmaniose, também ainda é necessária.

### **1.7 Justificativa**

A implementação de uma técnica para o diagnóstico de doenças parasitárias como a leishmaniose, que permita diferenciar espécies de parasitos com rapidez e eficiência, e determinar a carga parasitária em amostras clínicas, é fundamental para que seja realizado um tratamento adequado e eficaz com os pacientes, uma vez que espécies diferentes levam a diferentes formas clínicas da doença, com respostas imunológicas distintas, e o diagnóstico tardio muitas vezes pode comprometer o tratamento do paciente.

A espécie de *Leishmania* determina fortemente o curso da doença no hospedeiro vertebrado. Com isso, é essencial conhecer a identidade do parasito envolvido em cada foco de infecção. Além disso, a correta detecção e o conhecimento da espécie envolvida têm grandes implicações no entendimento da epidemiologia da doença, o desenvolvimento de estratégias de controle e o correto tratamento dos pacientes. Assim, a identificação de rotina pode ser necessária em diversas circunstâncias, principalmente quando da ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), em que normalmente há diversas espécies em simpatria, circulantes nas áreas endêmicas e que podem estar envolvidas na infecção.

Atualmente, uma metodologia eficaz, capaz de detectar e identificar a espécie do parasito envolvida na infecção, diretamente a partir de amostras clínicas, diminuindo assim as etapas de manipulação da amostra, ainda não está padronizada e bem estabelecida. A maioria das técnicas moleculares utilizadas para este fim envolvem várias etapas de ensaio, o que torna o processo demorado, custoso e laborioso, além de depender da expertise do profissional para realizá-los. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias para detecção e identificação de espécies, ou mesmo o aprimoramento de métodos existentes ainda se faz necessário. Isso possibilitaria também o preenchimento da lacuna no entendimento da epidemiologia das diferentes espécies de *Leishmania*, a sua relação com os vetores da doença e o aprimoramento diagnóstico das diferentes formas clínicas que acometem os pacientes.

## 2. Objetivos

- Padronizar os alvos 18S rDNA e HSP70 para quantificação de células de *Leishmania* por qPCR
- Comparar o percentual de positividade entre o alvo 18S rDNA e HSP70 em uma metodologia de qPCR no sistema Taqman,
- Validar a metodologia de determinação da carga parasitária utilizando amostras provenientes de pacientes com leishmaniose tegumentar da Região Amazônica do Brasil;
- Padronizar o HRM com os alvos mais informativos disponíveis para a identificação das espécies de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes;
- Determinar por HRM os alvos capazes de diferenciar as espécies de *Leishmania* circulantes no Brasil, estabelecendo um algoritmo para os complexos de espécie.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Amostras**

##### **3.1.1 Cepas e amostras de DNA**

As cepas selecionadas e utilizadas neste trabalho foram obtidas da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC - <http://clioc.fiocruz.br>), onde são mantidas criopreservadas em containers contendo nitrogênio líquido. Para o processo de descongelamento, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Todo o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio com meio bifásico, constituído na fase sólida por 15% de sangue de coelho e BHI-Agar (Sigma, Chemical Co, ST. Louis, EUA) [meio Novy-Nicolle-Mc Neal – NNN] e na fase líquida por meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado (Vitrocell, Campinas, SP., Brasil). Os tubos foram mantidos em estufa de BOD a 25°C. A viabilidade celular foi avaliada por microscopia óptica, considerando a movimentação dos parasitos.

Dezesseis cepas de *Leishmania* que correspondem às cepas de referência da CLIOC e representam 14 espécies distintas foram utilizadas para a padronização das reações de HRM. Posteriormente à etapa de padronização, 107 novas cepas que representam a diversidade genética intra e interespecífica das espécies que circulam no Brasil foram selecionadas (Anexo 1).

Para a padronização das reações de qPCR, foram utilizadas seis cepas de *Leishmania*, representantes de 4 espécies (Anexo 1). Para os ensaios de especificidade foram incluídas seis amostras de DNA de outras espécies de tripanossomatídeos: três espécies do gênero *Trypanosoma*, provenientes do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE) do IOC, e três espécies de outros gêneros da família Trypanosomatidae, provenientes da Coleção de Protozoários (COLPROT) do IOC (Anexo 1). Utilizou-se também DNA de hamster infectado com *L. (V.) guyanensis* e um DNA humano controle, extraído do sangue de um indivíduo saudável.

##### **3.1.2 Amostras clínicas**

Foram recebidas 92 amostras de DNA já extraído, a partir de amostras

biológicas obtidas de pacientes com suspeita clínica de LTA, atendidos no hospital Cemetrion/RO. A coleta das amostras biológicas foi realizada por meio de duas escovas cervicais estéreis, colocadas em contato direto com as lesões desses pacientes e armazenadas em solução de *RNA Later* (Ambion®, Carlsbad, CA/USA). Esse material foi fornecido pelo Laboratório de Epidemiologia Genética, da Fiocruz de Rondônia, e a identificação das espécies envolvidas nas infecções dessas amostras foi feita por RFLP, para o alvo Hsp70 c (Graça *et al.*, 2012) com as enzimas *HaeIII* e *Bstul*, pelos colaboradores responsáveis. Após o recebimento, esses DNAs foram utilizados para ambos os ensaios, qPCR e HRM (Anexo 2).

### **3.2 Cultivo dos parasitos, preparo de massas e extração de DNA para HRM**

As formas promastigotas foram mantidas em cultura sendo observadas a cada dois dias e submetidas semanalmente a passagem, em novo tubo de ensaio contendo meio bifásico, descrito em 3.1.1. Quando, baseado em uma análise semi-quantitativa, a amostra apresentava concentração de mais de 50 células por campo, uma alíquota de 1 mL era retirada do tubo de ensaio e transferida para uma garrafa de cultura de polipropileno com uma área de expansão de 25 m<sup>2</sup>, e acrescentados 10 mL de meio Schneider suplementado com 20% de SFB. Após três dias de crescimento, as amostras eram processadas para a produção de massas e posterior extração de DNA.

Após a expansão, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para um tubo cônico em polipropileno com capacidade para 15 mL e centrifugados a uma velocidade de 4000 rpm a uma temperatura de 4°C por 10 minutos. O sobrenadante era descartado e o pellet suspenso em 10 mL de tampão TE 2:1, constituído por 100 mL de solução Tris 1M e 100 mL de solução EDTA 0,5M. Esse processo foi repetido por duas vezes em 10 mL e 1 mL respectivamente. Após a última lavagem, o pellet obtido era transferido para um tubo de centrífuga em polipropileno com capacidade para 1,5 mL e mantido em congelador a -22°C. Foi utilizado o kit *Wizard™ Genomic DNA purification kit* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) para a extração do DNA seguindo as recomendações do fabricante. Os DNAs foram por fim quantificados em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e diluídos em água para uma concentração de 50ng/μL.

### **3.3 Produção de massas de parasitos e posterior extração de DNA das cepas de *Leishmania* utilizadas nas reações de qPCR**

As cepas de *Leishmania* utilizadas para as reações de qPCR, após a expansão, foram submetidas a contagem das células para o cálculo da concentração de parasitas por mililitro e assim o estabelecimento de uma concentração de  $10^6$  células/mL para a produção de massas para a extração de DNA.

Após a expansão, o conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para tubos cônicos em polipropileno com capacidade para 15 mL. Os tubos foram então centrifugados a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos. Foi realizada uma diluição seriada de 1:1000 para a contagem das células.

O pellet obtido no tubo cônico, após a centrifugação, foi resuspenso em 1 mL de meio Schneider puro. Desse 1 mL foram retirados 10 µL e transferidos para um tubo de centrífuga de 1,5 mL contendo 90 µL de meio Schneider puro. A mistura foi homogeneizada. Essa etapa foi repetida duas vezes para a obtenção dos parasitas diluídos em proporção 1:1000. Do último tubo de centrífuga, contendo a diluição 1:1000, foram retirados 10 µL da mistura e colocados em uma Câmara de Neubauer para a contagem das células.

Foram realizados os cálculos para a obtenção de duas concentrações:  $1 \times 10^6$  células por mL e  $1 \times 10^2$  células por mL. O volume correspondente a cada concentração foi transferido para um novo tubo cônico com capacidade de 15 mL, centrifugado e submetido ao processo de extração de DNA utilizando o kit *High Pure PCR Template Preparation kit* (Roche, Basileia, Suíça) segundo as recomendações do fabricante.

### **3.4 Reações de qPCR**

As reações de qPCR foram padronizadas com o sistema TaqMan e foram desenhados iniciadores e sondas para 2 alvos, HSP70 e 18S rDNA (Tabela 3.1). As reações foram realizadas utilizando o *FastStart Universal Master Mix* (Roche) e em multiplex com o alvo controle endógeno humano RNase P - *TaqMan RNase P Control Reagents Kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), e cada amostra foi utilizada em duplicata ou triplicata.

Tabela 3.1: Sequências de iniciadores e sondas utilizados neste estudo.

Alvo	Sequencia	Amplicon	Referência
18S rDNA	18S rDNA F 5'-GTACTGGGGCGTCAGAGGT-3' 18S rDNA R 5'-TGGGTGTCATCGTTTGCA-3' 18S rDNA Tq 5'- FAM AATTCTTAGACCGCACCAAG-NFQ-MGB-3'	155 pb	Desenhados para o presente trabalho
HSP70	HSP70 F 5'- CACCATCACCAACGACAAGG -3' HSP70 R 5'- GTCGGAGACCGTGTCTTCA -3' HSP70 Tq 5'- FAM CTGAGCAAGGACGAGAT -NFQ-MGB-3'	163 pb	Desenhados para o presente trabalho
RNAse P – VIC/TAMRA	Não disponível	Não disponível	Applied Biosystems
HSP70 P1	HSP70-P1 F 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' HSP70-P1 R 5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3'	1300 pb	Garcia <i>et al.</i> , 2004
HSP70 c	HSP70C F 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' HSP70C R 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3'	234 pb	Graça <i>et al.</i> , 2012
Iniciador 1	HSP70 F2 5'-GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG-3' HSP70C R 5'- TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3'	144 pb	Zampieri <i>et al.</i> , 2016/ Graça <i>et al.</i> , 2012
Iniciador 2	HSP70 F1 5'-AGCGCATGGTGAACGATGCGTC-3' HSP70 R1 5'-CTTCATCGAGTACGCGTAGTTCTCC-3'	104 pb	Zampieri <i>et al.</i> , 2016
COI 129	COI 129 F 5'-TGTAACCTCAGGATGACCAAAA-3' COI 129 R 5'-TGTTGTTGGTGGTGGTACTTA-3'	70 pb	Desenhados para o presente trabalho
COI 220	COI 220 F 5'-TCACACCACCAGCCAATACT-3' COI 220 R 5'-CGCTATTTATTTGAGCTGCTCTT-3'	74 pb	Desenhados para o presente trabalho
COI 367	COI 367 F 5'-ACGTCGACAACAGAAAATTGTACC-3' COI 367 R 5'-AGCCTTGCTTGTGATTCGT-3'	101 pb	Desenhados para o presente trabalho
COI 428	COI 428 F 5'-TCACAAGCAAGGCTTGAATGAA-3' COI 428 R 5'-AGGTATGGGTGTTGGTTGGA-3'	71 pb	Desenhados para o presente trabalho

### 3.4.1 Padronização das reações de qPCR

Foram testadas as seguintes combinações de concentrações de iniciadores *Forward* e *Reverse* para ambos os alvos usados (18S rDNA e HSP70): 150/150 nM, 300/150 nM, 450/150 nM, 150/300 nM, 300/300 nM, 450/300 nM, 150/450 nM, 300/450 nM e 450/450 nM. Foram testadas também cinco diferentes concentrações de sondas: 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM e 250 nM. Este teste foi realizado com DNA de uma cepa de *L. (V.) braziliensis* (IOCL 566) extraído a partir de uma concentração de  $10^4$  parasitas/mL. As reações foram realizadas utilizando 10  $\mu$ L (2X) de Master Mix em um volume final de reação de 20  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi 50°C por 2', 95°C por 10', 40 ciclos de 95°C por 15" e 60°C por 1', e 25°C -  $\infty$  (armazenamento até retirada do

equipamento). Foram testadas três temperaturas de anelamento: 59°C, 60°C e 61°C. Todas as reações foram realizadas em placas de 96 poços *MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 mL* (Applied Biosystems), utilizando o equipamento *7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems), e o software utilizado para a análise dos resultados foi o *7500 Software v2.3* (Applied Biosystems). O protocolo utilizado para as reações de qPCR após a padronização está representado na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Protocolo utilizado nas reações de qPCR com os reagentes usados e suas respectivas concentrações e quantidades por amostra para ambos os alvos estudados (HSP70 e 18S rDNA).

Reagente/concentração	Quantidade (poço)
Mastermix TaqMan Roche 2X	10 µL
Iniciador F ([Estoque]=10 µM/ [Final] =150 nM)	0,3 µL
Iniciador R ([Estoque]=10 µM/ [Final]=300 nM)	0,6 µL
Sonda Tq (FAM/MGB [Estoque]=10 µM/ [Final]=200nM)	0,4 µL
Mix RNase P (VIC/TAMRA [Estoque]=20X/ [Final] =1X)	1,0 µL
H <sub>2</sub> O	2,7 µL
Total Volume: 15 µL Mix de reação + 5 µL DNA	Volume total: 20 µL

### 3.4.2 Ensaios de linearidade, especificidade e sensibilidade do qPCR

Os ensaios de linearidade (curvas-padrão) para determinação do limite de detecção de cada alvo foram realizados separadamente e em multiplex utilizando o alvo controle RNase P e DNA da cepa de referência para a espécie *L. (V.) braziliensis* (IOCL 566). Utilizou-se uma diluição seriada em 10 pontos, em triplicata, começando com uma concentração de 10<sup>6</sup> parasitas/mL e indo até 10<sup>-3</sup> parasitas/mL. Para as reações em multiplex, foi realizada uma mistura em uma proporção 1:1 do DNA de *Leishmania* com o DNA comercial do kit *TaqMan RNase P Control Reagents* (Applied Biosystems). Os gráficos de representação das curvas-padrão foram construídos com o software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, California, EUA).

Os ensaios de especificidade e sensibilidade foram realizados em duplicata, em multiplex com o alvo controle endógeno humano RNase P. Além das cepas de *Leishmania*, foram incluídos seis DNAs de outras espécies de

triplanossomatídeos: três espécies do gênero *Trypanosoma* e três espécies de outros gêneros da família Trypanosomatidae (Anexo 1). Utilizou-se também DNA de hamster infectado com *L. (V.) guyanensis* e um DNA humano controle, extraído do sangue de um indivíduo saudável.

### 3.4.3 Validação da qPCR com amostras clínicas

Cinco amostras clínicas obtidas de pacientes com leishmaniose cutânea, positivas por microscopia e por PCR convencional foram utilizadas para a validação. No mesmo ensaio foi feita uma curva padrão com DNA de *Leishmania* para ambos os alvos testados, e com DNA comercial para o alvo controle RNase P, como descrito anteriormente.

### 3.4.4 Quantificação das amostras de pacientes

Após a validação do ensaio de qPCR com amostras clínicas, foi realizada a quantificação absoluta da carga parasitária de amostras obtidas de pacientes com suspeita clínica de LTA e provenientes da Fiocruz de Rondônia (Anexo 2). Os ensaios foram realizados para os alvos HSP70 e 18S rDNA em placas de 384 poços *MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems, EUA), sendo utilizado o robô *epMotion 5070* (Eppendorf, Alemanha) para a pipetagem automática, de acordo com o protocolo descrito na tabela 3.3, utilizando equipamento ViiA 7 (Applied Biosystems, EUA).

Para a obtenção dos valores de quantificação absoluta foi feita na mesma placa uma curva padrão com sete pontos, começando em  $10^6$  e indo até  $10^0$  par. eq./mL de *L. (V.) braziliensis*, para os dois alvos testados, e com DNA humano comercial para o alvo controle RNase P.

Tabela 3.3: Protocolo utilizado para a quantificação absoluta das amostras de pacientes para os dois alvos testados (HSP70 e 18S rDNA).

Reagente/concentração	Quantidade (poço)
Mastermix TaqMan Roche 2X	5 µL
Iniciador F ([Stock]=10 µM/ [Final] =150 nM)	0,15 µL
Iniciador R ([Stock]=10 µM/ [Final]=300 nM)	0,3 µL
Sonda Tq (FAM/MGB [Stock]=10 µM/ [Final]=200nM)	0,2 µL

Mix RNase P (VIC/TAMRA [Stock]=20X/ [Final] =1X)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	0,85 µL
Total Volume: 7 µL Reaction Mix + 3 µL DNA	Volume total: 10 µL

Foi obtido o log da quantidade de *Leishmania* de cada paciente a partir da fórmula obtida da curva padrão utilizada:  $y = -3,44x + 39,93$ , para o HSP70, e  $y = -3,41x + 38,60$ , para o 18S rDNA, em que “x” é o valor de  $C_t$  obtido e “y” o valor da quantidade de *Leishmania* em log. O mesmo cálculo foi realizado para obtenção do valor de log da quantidade de DNA humano, através da fórmula obtida da curva padrão utilizada para RNase P:  $y = -3,39x + 24,80$ , em multiplex com o HSP70, e  $y = -3,91x + 25,47$ , em multiplex com o 18S rDNA, em que “x” é o valor de  $C_t$  obtido e “y” o valor da quantidade de DNA humano em log.

Para obter-se as quantidades de *Leishmania*, os valores dos logs foram passados para a escala linear através do seguinte cálculo:

$$10^{\log \text{Quant Leish}} = \text{quantidade de } Leishmania.$$

O mesmo procedimento foi realizado para os valores da quantidade de DNA humano, sendo estes calculados da mesma forma:

$$10^{\log \text{Quant RNase P}} = \text{quantidade de DNA humano.}$$

A partir desses cálculos foi possível obter a quantidade normalizada de parasita por micrograma de DNA humano de cada amostra em duplicata para os dois alvos ao dividirmos o valor da quantidade de *Leishmania* pelo valor da quantidade de DNA humano.

### 3.4.5 Análises estatísticas

Após a quantificação da carga parasitária de *Leishmania* com os alvos HSP70 e 18S rDNA foram obtidos os valores de amostras positivas, verdadeiro-negativas e os valores de carga máxima e mínima para cada alvo. Foram calculados também a mediana e os intervalos interquartis (25% e 75%) das cargas parasitárias para cada alvo. Foram chamadas de amostras verdadeiro-negativas as amostras que apresentaram amplificação para o alvo controle

endógeno humano (RNAse P) e não apresentaram amplificação para um ou ambos os alvos específicos de *Leishmania* (HSP70 e 18S rDNA).

Foram calculadas a sensibilidade e especificidade de cada método de quantificação da carga parasitária (por HSP70 ou por 18S rDNA), ou com relação à microscopia, ou com relação a PCR convencional para o alvo HSP70.

Para os cálculos de sensibilidade e especificidade, para a comparação dos métodos, foram consideradas amostras verdadeiro-positivas as amostras positivas nas duas metodologias em comparação; falso-positivas as que foram positivas somente na metodologia comparada na posição de padrão-ouro; falso-negativas as que foram negativas somente na metodologia comparada na posição de padrão-ouro; e verdadeiro-negativas as que foram negativas nas duas metodologias. Com isso, foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade, sendo a sensibilidade dada pela fórmula  $a/(a+c)$ , onde “a” é o número de amostras verdadeiro-positivas e “c” o número de amostras falso-negativas. Já a especificidade foi dada pela fórmula  $d/(b+d)$ , onde “d” é o número de amostras verdadeiro-negativas e “b” é o número de amostras falso-positivas.

Foi utilizada também a análise de concordância Bland-Altman para comparar a carga parasitária determinada pelos alvos 18S rDNA e HSP70. A média obtida pelos dois alvos foi comparada à diferença entre eles. Essas análises foram realizadas com o programa SigmaPlot (Systat Software).

### **3.5 HRM – High Resolution Melting**

As reações de HRM foram padronizadas para dois alvos: Citocromo Oxidase I (COI) e proteína de choque térmico 70 (HSP70), sendo que para este último três pares de iniciadores foram utilizados e quatro para o COI (Tabela 2).

#### **3.5.1 HSP70**

##### **3.5.1.1 Padronização**

Para o alvo HSP70 c (da Graça *et al.*, 2012) foi realizado um gradiente com cinco diferentes concentrações de iniciadores e com duas diferentes concentrações de DNA (Tabela 3.4). A partir disso, foram definidas as concentrações dos iniciadores e DNA a serem utilizadas: 0,6 pmol/ $\mu$ L de cada

iniciador e 150 ng/ $\mu$ L de DNA. As reações foram realizadas com *MeltDoctor*<sup>TM</sup> *HRM Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) a 1x na reação, em um volume total de 10  $\mu$ L. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, com triplicatas técnicas utilizando o kit *MeltDoctor*<sup>TM</sup> *HRM Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) de acordo com os protocolos desenvolvidos para tipagem por HRM. As reações foram montadas em placas de 96 poços *MicroAmp*<sup>TM</sup> *Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL* (Applied Biosystems, EUA) e corridas no equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA).

Tabela 3.4: Combinação de concentrações de DNA e iniciadores testadas para o alvo HSP70.

DNA	INICIADORES				
100 ng/ $\mu$ L	0,1 pmol/ $\mu$ L	0,2 pmol/ $\mu$ L	0,4 pmol/ $\mu$ L	0,6 pmol/ $\mu$ L	0,8 pmol/ $\mu$ L
150 ng/ $\mu$ L					

Ainda para o alvo HSP70 foram reproduzidos os protocolos descritos por Zampieri *et al.* 2016 com um painel amplo de amostras (Anexo 1). Os iniciadores descritos por esse trabalho e utilizados nessas reações estão representados no Anexo 1. O protocolo utilizado para os dois iniciadores está descrito na tabela 3.5. Uma vez confirmada a reprodutibilidade do protocolo publicado, testamos um painel de 97 cepas selecionadas de acordo com a diversidade de espécies de *Leishmania* de importância médica que circulam no Brasil, composto principalmente por cepas isoladas nos estados brasileiros que compõem a região amazônica do país (Anexo 1).

As reações foram realizadas em placas 384 poços *MicroAmp*<sup>TM</sup> *Optical 384-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems, EUA), sendo utilizado o robô *epMotion 5070* (Eppendorf, Alemanha) para a pipetagem automática, e corridas no equipamento *ViiA 7* (Applied Biosystems, EUA), utilizando uma temperatura de anelamento de 60°C. Três diferentes concentrações de DNA (25 ng, 2,5 ng e 0,25 ng) das cepas IOCL 565, IOCL 566 e IOCL 579 foram utilizadas para verificar a possível influência da concentração de DNA no perfil da curva de dissociação.

Tabela 3.5: Protocolo utilizado para as reações de HRM segundo descrito por Zampieri *et al.* 2016.

Reagente/concentração	Quantidade (poço)
MeltDoctor™ HRM Master Mix 2X	5 µL
Iniciador F ([Estoque]=10 µM/ [Final] =200 nM)	0,2 µL
Iniciador R ([Estoque]=10 µM/ [Final]=200 nM)	0,2 µL
H <sub>2</sub> O	2,1 µL
Total Volume: 7,5 µL Mix de reação + 2,5 µL DNA ([Estoque]10ng/µL)	Volume total: 10 µL

### 3.5.1.2 Ensaios de reprodutibilidade

Para um ensaio em duplicata com triplicatas técnicas utilizamos cepas de referência que representam as espécies circulantes na região amazônica do Brasil, provenientes do estado de Rondônia (RO) (Anexo 1) . A duplicata do ensaio foi realizada segundo o protocolo descrito na tabela 3.6 e em dias diferentes. Dessa forma, pôde ser avaliada a reprodutibilidade dos perfis obtidos para as cepas selecionadas.

### 3.5.1.3 Aplicação em amostras clínicas

Amostras clínicas de pacientes com leishmaniose cutânea, previamente caracterizadas e provenientes da Fiocruz – RO, foram usadas para validação do HRM. Estas foram ensaiadas juntamente com um painel composto por algumas das cepas representadas na Anexo 1. As reações foram realizadas segundo o protocolo descrito na tabela 3.6.

Tabela 3.6: Protocolo utilizado para a caracterização das amostras clínicas por HRM.

Reagente/concentração	Quantidade (poço)
MeltDoctor™ HRM Master Mix 2X	5 µL
Iniciador F ([Estoque]=10 µM/ [Final] =200 nM)	0,2 µL
Iniciador R ([Estoque]=10 µM/ [Final]=200 nM)	0,2 µL
H <sub>2</sub> O	1,6 µL
Total Volume: 7 µL Mix de reação + 3 µL DNA ([Estoque]10ng/µL)	Volume total: 10 µL

### 3.5.2 COI

Foram desenhados quatro pares de iniciadores para o alvo Citocromo Oxidase I (COI), utilizado no Projeto *Barcode of Life* (Tabela 3.1). Os iniciadores foram desenhados a partir do alinhamento de 242 sequências já obtidas no Lab. de Pesquisa em Leishmaniose do IOC flanqueando regiões polimórficas (Figuras de 3.1 a 3.4) que potencialmente promoveriam distintos perfis de dissociação e portanto permitiriam a diferenciação de espécies.

AMOSTRAS	T	A	G	C	A	G	G	C	T	C	A	A	A
Leishmania lainsoni 1023	.	.	A	T	.	A	.	T	.	T	.	G	T
Leishmania major 51	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 133	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 183	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 186	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 574	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 581	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 867	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 895	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 1044	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 1231	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 1840	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 2728	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania major 2798	.	.	A	.	.	.	.	T	.	T	.	G	.
Leishmania naiffi 854	.	.	A	T	.	A	A	T	.	T	.	G	T
Leishmania naiffi 993	.	.	A	T	.	A	A	T	.	T	.	G	T
Leishmania naiffi 3007	.	.	A	T	.	A	A	T	.	T	.	G	T
Leishmania naiffi 1365	.	.	A	T	.	A	A	T	.	T	.	G	T
Leishmania naiffi 3310	.	.	A	T	.	A	A	T	.	T	.	G	T
Leishmania panamensis 240	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 243	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3284	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3285	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3286	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3287	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3288	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3293	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3294	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T
Leishmania panamensis 3297	.	.	A	T	.	A	A	.	.	T	.	.	T

Leishmania panamensis 3301	. . A T . A A . . T . . T
Leishmania panamensis 3302	. . A T . A A . . T . . T
Leishmania shawi 1545	. . A T . A A . . T . . T
Leishmania shawi 3481	. . A T . A A . . T . . T
Leishmania shawi 1068	. . A T . A A . . T . . T
Leishmania shawi 1066	. . A T . A A . . T . . T
Leishmania tarentolae 2278	. . A A . T A T . T . . T
Leishmania tarentolae 2279	. . A A . T A T . T . G T
Leishmania tropica 571	. . A T . . A T . T . . G
Leishmania tropica 572	. . A T . . A T . T . . G
Leishmania turanica 2064	C . A T . A . T . T . . .
Leishmania donovani 563	. . A A . . . T . T . . .
Leishmania donovani 2800	. . A A . . . T . T . . .
Leishmania donovani 2272	. . A A . . . T . T . . .
Leishmania lainsoni 3315	. . A T . A . T . T . G T
Leishmania guyanensis 2692	. . A T . A A . . T . . T
Leishmania braziliensis 3451	. . . T . A A T . T . . T

Figura 3.1: Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 129. Consiste em uma substituição C>T em cepas de *L. (V.) naiffi*, destacada em vermelho. As cepas diferenciadas por este iniciador estão destacadas em cinza escuro.

AMOSTRAS	T	G	T	A	C	T	T	A	C	A	A	T	T	A	G	C	G	T
Leishmania infantum 579	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 656	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 1238	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 2301	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 2906	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 2990	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 3034	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 3049	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 3053	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 3068	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania infantum 3249	C	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania donovani 2800	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania donovani 563	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania donovani 2272	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Leishmania lainsoni 1023	.	.	A	.	T	.	.	.	A	.	G	.	A	G	.	A	.	.
Leishmania major 51	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.

Leishmania major 133	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 183	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 186	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 574	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 581	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 867	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 895	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 1044	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 1231	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 1840	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 2728	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania major 2798	. . . . T . . . . . . . A . . . . A . . .
Leishmania naiffi 854	. . A . T . . . G A . G . A G . A . . .
Leishmania naiffi 993	. . A . T . . . G A . G . A G . A . . .

Figura 3.2: Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 220. Consiste em uma substituição T>C em cepas de *L. (L.) infantum*, destacada em vermelho. As espécies diferenciadas por este iniciador estão destacadas em cinza escuro.

AMOSTRAS	A G C A A A G A T T A A A G A T A A G A A G T C G A A A
Leishmania major 1231	. . T . . T . G . . . . T . T C . T A . G A A . . . . .
Leishmania major 1840	. . T . . T . G . . . . T . T C . T A . G A A . . . . .
Leishmania major 2728	. A T . . T . G . . . . T . T C . T A . T A A . . . . .
Leishmania major 2798	. . T . . T . G G . . . . T . T C . T A . G A A . . . . .
Leishmania naiffi 854	C A . . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania naiffi 993	C A . . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania naiffi 3007	C A . . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 240	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 243	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3284	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3285	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3286	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3287	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3288	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3293	T A T . . T . G . . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .

Leishmania panamensis 3294	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3297	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3301	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania panamensis 3302	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A . T . . . . .
Leishmania shawi 1545	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania shawi 3481	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania shawi 1068	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania shawi 1066	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania guyanensis 2692	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania guyanensis 2963	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania guyanensis 2410	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania guyanensis 2338	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania guyanensis 2336	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .
Leishmania guyanensis 2405	T A T . . T . G . . . . . T C . . . . . A <b>C</b> T . . . . .

Figura 3.3: Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 367. Consiste em uma substituição T>C em cepas de *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*, destacada em vermelho. As espécies diferenciadas por este iniciador estão destacadas em cinza escuro.

AMOSTRAS	A T T T T A A G A G G G T A C G T G
Leishmania major 1231	G . . . . . A . . T . C .
Leishmania major 1840	G . . . . . A . . T . C .
Leishmania major 2728	G . . . . . A . G G . C .
Leishmania major 2798	G . . . . . A . . T . C .
Leishmania naiffi 854	G . C A . . . . . A . . T A A .
Leishmania naiffi 993	G . C A . . . . . A . . T A A .
Leishmania naiffi 3007	G . C A . . . . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 240	G . C A C . . . <b>C</b> . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 243	G . C A C . . . <b>C</b> . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3284	G . C A C . . . <b>C</b> . . A . . T A A .
Leishmania panamensis	G . C A C . . . <b>C</b> . . A . . T A A .

3285	
Leishmania panamensis 3286	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3287	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3288	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3293	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3294	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3297	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3301	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania panamensis 3302	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania shawi 1545	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania shawi 3481	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania shawi 1068	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania shawi 1066	G . C A C . . . C . . A . . T A A .
Leishmania guyanensis 2692	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2963	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2410	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2405	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2336	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2334	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2337	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2338	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania guyanensis 2356	G . C A C . . . T . . . . . T A A .
Leishmania tarentolae	. A . . . . . T . . A . . . A . .

2278	
Leishmania tarentolae	. . . . . T . . A . . T A . .
2279	
Leishmania tropica 571	. . . . . G . . . . . A . . . . A . .

Figura 3.4: Polimorfismo no qual foi baseado o desenho do iniciador COI 428. Consiste em uma substituição A>C em cepas de *L. (V.) shawi* e *L. (V.) panamensis*, e A>T em cepas de *L. (V.) guyanensis*, destacadas em vermelho. As espécies diferenciadas por este iniciador estão destacadas em cinza escuro.

### 3.5.2.1 Padronização HRM - COI

Foi realizado um gradiente de concentração de iniciadores em que foram testadas cinco diferentes concentrações, conforme demonstrado na tabela 3.7 utilizando cepas de referência (Anexo 1). As reações foram realizadas segundo o protocolo descrito na tabela 3.8, empregando *MeltDoctor™ HRM Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) em placas de 96 poços *MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL* (Applied Biosystems, EUA) e corridas no equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA).

Tabela 3.7: Concentrações de iniciadores testadas para o alvo COI.

DNA	INICIADORES				
150 ng/μL	0,1 pmol/μL	0,2 pmol/μL	0,3 pmol/μL	0,6 pmol/μL	0,9 pmol/μL

Tabela 3.8: Protocolo usado para as reações com os iniciadores do alvo COI para avaliação da diferenciação espécie-específica.

Reagente/concentração	Quantidade (poço)
MeltDoctor™ HRM Master Mix 2X	5 μL
Iniciador F ([Estoque]=10 μM/ [Final] =300 nM)	0,3 μL
Iniciador R ([Estoque]=10 μM/ [Final]=300 nM)	0,3 μL
H <sub>2</sub> O	2,4 μL
Total Volume: 8 μL Mix de reação + 2 μL DNA ([Estoque]50ng/μL)	Volume total: 10 μL

### 3.5.3 Análise dos resultados de HRM

As análises dos resultados de HRM foram realizadas com o software *QuantStudio™ Software V1.3* para *ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA). Os valores de *threshold* e *baseline* de amplificação foram mantidos nas configurações automáticas e as análises foram feitas comparando cada amostra individualmente às cepas padrões. Para isso omitia-se todas as outras amostras, deixando aberta para análise somente a cepa a ser identificada e as cepas padrões. As replicatas que não reproduziram os resultados foram desconsideradas.

### 3.5.4 Sequenciamento

As cepas que compunham o painel selecionado para validação do HRM foram sequenciadas para a comparação e confirmação dos resultados obtidos com o HRM. As cepas foram amplificadas para o alvo HSP70 (Garcia et. al. 2004), os produtos amplificados foram purificados utilizando kit QIAGEN (segundo instruções do fabricante) e submetidos a reações de sequenciamento. As reações foram realizadas com *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (ThermoFisher Scientific, EUA), de acordo com as especificações do fabricante, em placas de 96 poços, utilizando uma concentração de 3,2 pmol de cada iniciador (F e R) e 1,6 µL do produto de PCR purificado. As sequências obtidas foram analisadas usando o script *Phred/Phrap/Consed* e alinhadas com o programa MEGA 7 (Gordon D. 2003). Uma busca utilizando o algoritmo BLAST (ncbi.gov) foi feita para confirmação da espécie.

## 4. Resultados

### 4.1 qPCR

#### 4.1.1 Determinação das concentrações de iniciadores e sondas

As concentrações a serem usadas nas reações de qPCR foram determinadas a partir dos resultados das curvas de iniciadores e sondas, realizadas com diferentes combinações de concentrações. As concentrações escolhidas foram aquelas para as quais obteve-se os menores valores de  $C_t$  (*threshold cycle*) para os dois alvos (18S rDNA e HSP70) (Tabelas 4.1 e 4.2). Após o teste com três diferentes temperaturas de anelamento, a temperatura de 60°C foi determinada para as reações.

Tabela 4.1: Concentrações de sondas testadas para cada alvo, com a concentração de 200 nM apresentando os menores valores de  $C_t$  para 18s rDNA e HSP70 (em negrito).

Alvos	50nM ( $C_t$ médio±dp)	100nM ( $C_t$ médio±dp)	150nM ( $C_t$ médio±dp)	200nM ( $C_t$ médio±dp)	250nM ( $C_t$ médio±dp)
HSP70	27.61 ± 0.09	27.26 ± 0.19	26.96 ± 0.19	<b>26.55 ± 0.03</b>	26.63 ± 0.13
18S rDNA	28.74 ± 0.68	27.86 ± 0.42	27.71 ± 0.37	<b>27.58 ± 0.19</b>	27.94 ± 0.94

Tabela 4.2: Diferentes combinações de iniciadores testadas para os alvos 18s rDNA e HSP70, respectivamente, com a combinação 150/300 nM (em negrito) apresentando o menor valor de  $C_t$ .

Concentrações	18S rDNA ( $C_t$ médio±dp)	HSP70 ( $C_t$ médio±dp)
150/150 nM	27.35 ± 0.18	31.94 ± 0.00
300/150 nM	27.63 ± 0.31	32.53 ± 0.18
450/150 nM	27.74 ± 0.14	32.90 ± 0.09
<b>150/300 nM</b>	<b>27.08 ± 0.08</b>	<b>31.07 ± 0.13</b>
300/300 nM	27.59 ± 0.34	31.40 ± 0.11
450/300 nM	27.69 ± 0.22	31.69 ± 0.09

150/450 nM	27.27 ± 0.10	31.26 ± 0.20
300/450 nM	27.56 ± 0.17	31.27 ± 0.05
450/450 nM	27.60 ± 0.15	31.90 ± 0.08

#### 4.1.2 Ensaios de linearidade

Foram realizados os ensaios de linearidade (curvas-padrão) para determinação do limite de detecção de cada alvo utilizando a cepa IOCL 566 (*L. (V.) braziliensis*). Para o alvo HSP70 foram detectados cinco pontos da curva, variando entre  $10^6$  parasitas/mL até  $10^2$  parasitas/mL. Para o alvo 18S rDNA, foram detectados seis pontos da curva, entre  $10^6$  parasitas/mL e  $10^0$  parasitas/mL (Figura 4.1 e Tabela 4.3).

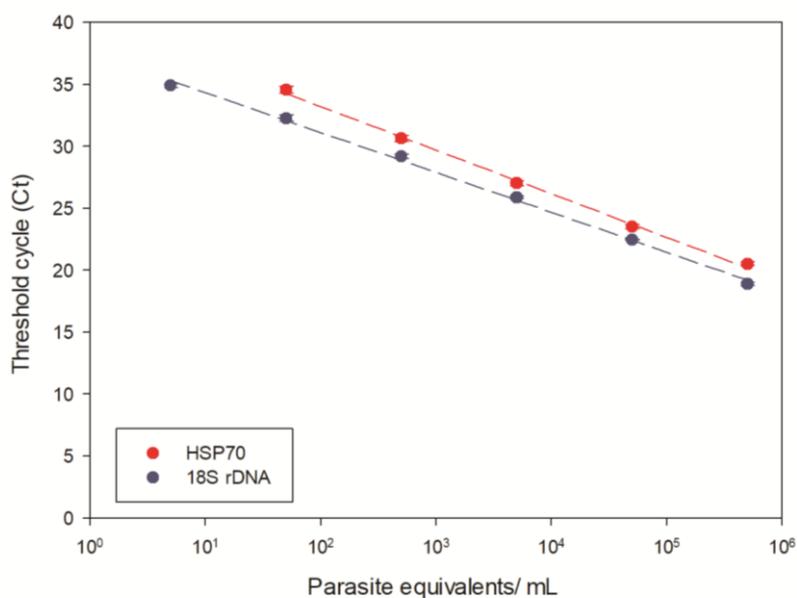


Figura 4.1: Extensão dinâmica da detecção de *L. (V.) braziliensis* para os dois alvos estudados (18S rDNA e HSP70).

Tabela 4.3: Valores do ensaio de linearidade para ambos os alvos com *L. (V.) braziliensis*.  $r^2$  – coeficiente de linearidade.

Alvo	Inclinação	Intersecção	$r^2$	Eficiência da PCR (%)
HSP70	-3.50	40.14	0.99	93.24
18S rDNA	-3.24	37.66	0.99	103.39

Para o ensaio de linearidade do alvo controle endógeno humano RNase P, com o DNA comercial do kit, em multiplex com os dois alvos estudados (18S rDNA e HSP70), utilizamos a proporção 1:1 do DNA comercial humano com o DNA de *L. (V.) braziliensis*. Foram detectados cinco pontos na curva, entre 10 ng/μL de DNA comercial e 10<sup>6</sup> parasitas/mL do DNA de *Leishmania*, e 0,0032 ng/μL DNA humano (em multiplex com HSP70) e 10<sup>1</sup> parasitas/mL (Figura 4.2 e Tabela 4.4).

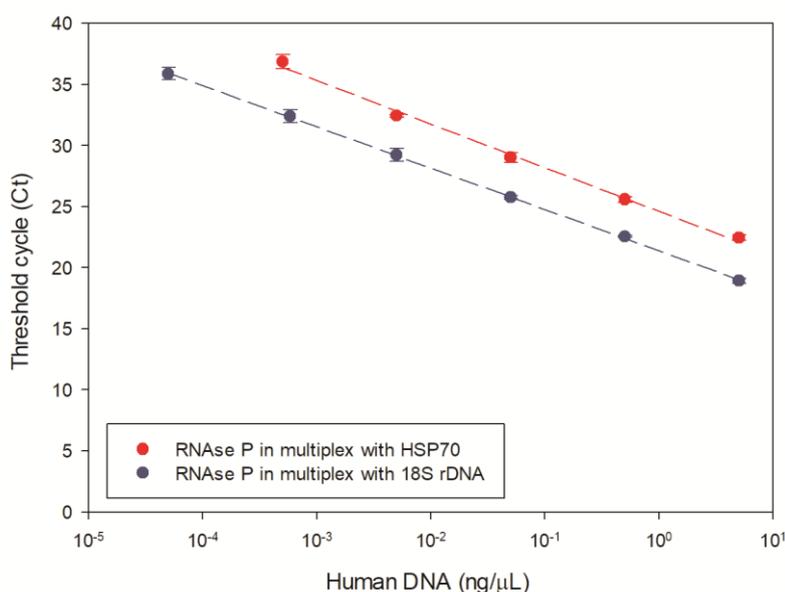


Figura 4.2: Extensão dinâmica de detecção para RNase P em multiplex com os alvos estudados (18S rDNA e HSP70).

Tabela 4.4: Valores do ensaio de linearidade para RNase P em multiplex.  $r^2$  – coeficiente de linearidade.

Alvo	Inclinação	Intersecção	$r^2$	Eficiência da PCR (%)
RNase P+HSP70	-3.55	25.20	0.99	91.19
RNaseP+18SrDNA	-3.30	25.39	0.99	100.96

#### 4.1.3 Ensaios de especificidade e sensibilidade

Nos ensaios de especificidade e sensibilidade outras espécies de tripanossomatídeos foram incluídas (Anexo 1). O HSP70 apresentou amplificação apenas para as espécies do gênero *Leishmania*, enquanto que o

alvo 18S rDNA amplificou também todas as espécies de tripanossomatídeos testadas. No entanto, seus valores de  $C_t$  foram menores do que os obtidos com o HSP70 para todas as amostras (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Ensaios de especificidade e sensibilidade com os respectivos valores de  $C_t$  obtidos para cada amostra, mostrando a maior sensibilidade do alvo 18S rDNA e a maior especificidade do alvo HSP70.

Amostras	18S rDNA ( $C_t$ médio $\pm$ dp )		HSP70 ( $C_t$ médio $\pm$ dp )	
	<i>Leishmania</i>	RNAseP	<i>Leishmania</i>	RNAseP
<i>L. braziliensis</i> 566 $10^6$ parasitos/mL	17.81 $\pm$ 0.62	ND	18.39 $\pm$ 0.26	ND
<i>L. braziliensis</i> 3356 $10^6$ parasitos/mL	12.68 $\pm$ 0.25	ND	13.16 $\pm$ 0.40	ND
<i>L. guyanensis</i> 565 $10^6$ parasitos/mL	15.48 $\pm$ 0.03	ND	27.09 $\pm$ 0.15	ND
<i>L. guyanensis</i> 2371 $10^6$ parasitos/mL	15.17 $\pm$ 0.16	ND	26.76 $\pm$ 0.02	ND
<i>L. panamensis</i> 240 $10^6$ parasitos/mL	18.79 $\pm$ 0.42	ND	32.09 $\pm$ 2.04	ND
<i>L. panamensis</i> 1048 $10^6$ parasitos/mL	18.53 $\pm$ 0.10	ND	32.70 $\pm$ 0.21	ND
<i>L. amazonensis</i> 575 $10^6$ parasitos/mL	17.41 $\pm$ 0.01	ND	34.52 $\pm$ 0.18	ND
<i>T. cruzi</i> CL 100 pg/ $\mu$ L	21.28 $\pm$ 0.38	ND	ND	ND
<i>T. rangeli</i> 10 pg	34.01 $\pm$ 0.64	ND	ND	ND
<i>T. marinkelli</i> 10 pg/ $\mu$ L	28.96 $\pm$ 0.01	ND	ND	ND
<i>C. fasciculata</i> 156 pg/ $\mu$ L	23.56 $\pm$ 0,21	ND	ND	ND
<i>L. pyrrocoris</i> 200 pg/ $\mu$ L	19.32 $\pm$ 0.06	ND	38.13 $\pm$ 0.86	ND
<i>H. muscarum</i> 213	29.74 $\pm$ 0.15	ND	ND	ND

pg/ $\mu$ L				
DNA humano (Applied Biosystems) 100 pg/ $\mu$ L	ND	29.01 $\pm$ 0.39	ND	29.19 $\pm$ 0.62
DNA de hamster infectado com <i>L. guyanensis</i> 473 pg/ $\mu$ L	32.74 $\pm$ 0.39	ND	ND	ND

#### 4.1.4 Quantificação das amostras de pacientes e comparação dos alvos

Noventa e duas amostras de DNA, extraído a partir de escovado cervical de pacientes com suspeita de LTA, e provenientes da Fiocruz de Rondônia, foram submetidas a uma reação de qPCR para a quantificação absoluta da carga parasitária com os alvos HSP70 e 18S rDNA (Tabela 4.6). O objetivo deste ensaio foi comparar o percentual de positividade e a concordância dos valores médios de  $C_t$  entre os alvos testados, em amostras de pacientes, utilizando como controle interno a RNase P humana. Os anexos 3, 4 e 5 apresentam os valores médios de  $C_t$ , as quantidades de *Leishmania* e de DNA humano para cada duplicata, e a quantidade normalizada (equivalente de parasitas por micrograma de DNA humano) para os alvos HSP70 e 18S rDNA.

Tabela 4.6: Valores da carga parasitária normalizada (parasitas por micrograma de DNA humano), para ambos os alvos, em amostras de DNA de pacientes com suspeita clínica de LTA.

	<b>HSP70</b>	<b>18S rDNA</b>
<b>Amostra</b>	<b>Carga normalizada (Par/<math>\mu</math>g)</b>	<b>Carga normalizada (Par/<math>\mu</math>g)</b>
<b>388</b>	0,86	0,88
<b>389</b>	4,26	2,98
<b>391</b>	2,15	8.836,32
<b>394</b>	5.120	23.951,66
<b>395</b>	909,05	1.808,66

396	11.126,35	12.842,43
397	7,91	4,21
398	<b>NEGATIVO</b>	0,65
399	10.168,61	9.397,42
400	6.569,40	5.115,77
402	29,72	12,35
403	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
404	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
405	123,16	106,71
406	<b>NEGATIVO</b>	4,23
408	112,34	127,58
409	0,34	0,18
411	249,27	247,23
412	8.765,70	7.859,86
413	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
414	15.439,61	11.772,27
415	0,25	0,56
417	33	53,35
418	200,22	100,49
419	547,74	333,03
420	<b>NEGATIVO</b>	0,27
421	0,53	0,23
422	1,09	0,45
423	1.001,87	575,19
424	290.531,23	164.907,42
425	1,57	1,98
426	7,91	4,88
427	486,60	233,20
428	3,56	2,44
429	<b>NEGATIVO</b>	0,44
430	<b>NEGATIVO</b>	0,20
431	1	0,25
432	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>

433	<b>NEGATIVO</b>	0,80
434	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
435	<b>NEGATIVO</b>	0,19
436	390,68	478,66
437	10,94	13,61
438	<b>NEGATIVO</b>	0,53
439	169,79	76,93
440	<b>NEGATIVO</b>	0,82
441	647,05	506,35
442	167,63	302,11
443	28,36	37,53
444	13.868,70	14.067,92
445	1,66	0,67
446	37.991,56	27.295,49
447	420,12	619,26
448	744,21	293,95
449	<b>NEGATIVO</b>	0,18
450	91,25	187,86
451	29,70	71,55
452	459,10	270,69
453	3,17	1,95
454	284,24	258,23
455	<b>NEGATIVO</b>	0,63
456	<b>NEGATIVO</b>	0,04
457	<b>NEGATIVO</b>	275,51
458	6,32	2.834,52
459	27,60	36,63
460	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
462	122,58	118,82
464	0,88	3,21
465	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
466	35,71	53,03
467	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>

468	81,36	1.149,50
469	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
470	<b>NEGATIVO</b>	0,57
471	1,18	0,73
472	0,20	0,50
473	<b>NEGATIVO</b>	0,20
474	<b>NEGATIVO</b>	0,09
475	40,47	95,73
476	400,97	371,65
477	9,45	12,82
479	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
480	0,09	0,23
481	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
482	230,64	355,68
484	15,67	21,56
485	1,08	1,37
486	0,21	0,14
487	<b>NEGATIVO</b>	0,18
488	1.219,56	851,87
489	154,18	347,54
490	<b>NEGATIVO</b>	0,20

A partir dos resultados obtidos, foram calculados o número total de amostras positivas, de amostras verdadeiro-negativas, a mediana da carga parasitária, além das cargas máxima e mínima para os dois alvos (Tabela 4.7). O alvo 18S rDNA foi capaz de detectar 20 amostras positivas a mais do que o alvo HSP70. No entanto, os dois alvos apresentaram valores de carga parasitária normalizada (Par/ $\mu$ g) muito próximos, indicando o potencial do alvo HSP70 para a quantificação da carga parasitária em *Leishmania*.

Tabela 4.7: Valores totais de amostras de DNA de pacientes positivos e negativos, com a mediana e cargas máxima e mínima, mediana da quantidade de DNA humano, e seus valores máximos e mínimos.

	<b>HSP70</b>	<b>18S rDNA</b>
<b>Amostras positivas:</b>	63	81
<b>Amostras verdadeiro-negativas:</b>	29	11
<b>Mediana carga parasitária:</b>	40,47	106,71
<b>Carga máxima:</b>	290.531,23	164.907,42
<b>Carga mínima:</b>	0,09	0,04

Foram gerados gráficos de distribuição de pontos, a partir desses valores (Figura 4.3). Para ambos os alvos os valores de carga parasitária foi muito similar mostrando que a maioria das amostras apresentou uma carga entre 0,1 e 1.000 Par./ $\mu$ g DNA humano. Algumas amostras, no entanto, apresentaram uma carga entre 10.000 e 1.000.000 Par./ $\mu$ g DNA humano (11 amostras para o 18S rDNA e 8 amostras para o HSP70). A mediana das cargas parasitárias para ambos os alvos também foi similar, em torno de 10.000 Par./ $\mu$ g DNA humano, sendo mais um fator indicativo da boa concordância entre os dois alvos.

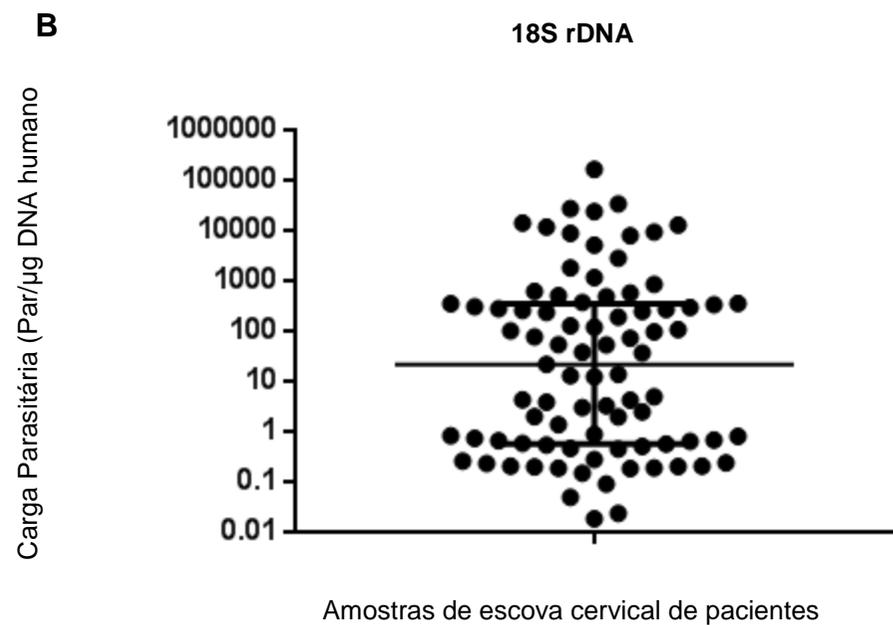
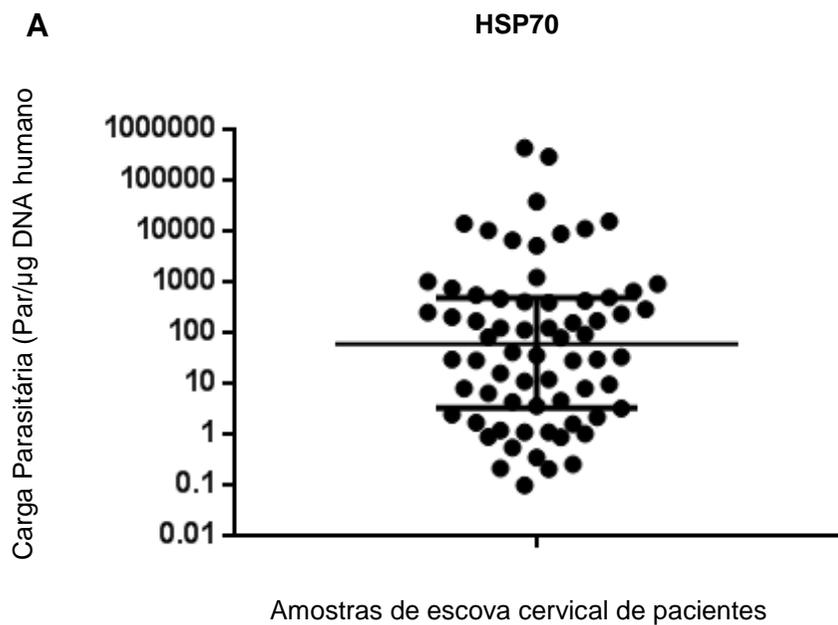


Figura 4.3: Gráfico de dispersão de pontos das amostras dos 63 pacientes positivos para o alvo HSP70 (A) e 81 positivos para o alvo 18S rDNA (B). No eixo “y” estão representadas as cargas parasitárias (Eq. Par./μg DNA humano), em escala logarítma, e no eixo “x” estão representadas as amostras de pacientes. As barras representadas na figura indicam os intervalos interquartis (25%-75%) e a mediana dos valores das cargas parasitárias.

Para comparação dos dados, foram calculados os percentuais de sensibilidade e especificidade de todos os métodos e alvos (qPCR e PCR convencional, HSP70 e 18S) em relação à microscopia como padrão ouro (Tabela 4.8). As amostras clínicas utilizadas foram obtidas de pacientes com suspeita de LTA, para as quais já havia sido realizado previamente a microscopia do raspado da lesão e/ou por PCR convencional seguida de RFLP para o alvo HSP70 c (Graça *et al.* 2012).

A cPCR para o alvo HSP70 se mostrou o método mais sensível para a detecção de *Leishmania*, apresentando um percentual de 97% de amostras positivas, enquanto que, com a qPCR, para o alvo HSP70 foi obtido um percentual de 84%, se mostrando menos sensível que a qPCR para o alvo 18S rDNA, o qual apresentou 91% de amostras positivas (Tabela 4.8). Já nos cálculos de especificidade, a qPCR para o alvo HSP70 se demonstrou o método mais específico, com 59% de detecção de amostras verdadeiro-negativas, enquanto que a cPCR para o alvo HSP70 apresentou 44%, e a qPCR para o alvo 18S rDNA apresentou 18%, considerando a microscopia como padrão-ouro (Tabela 4.8).

Levando em consideração o resultado da sensibilidade para a cPCR, foram calculados novamente os valores de sensibilidade e especificidade para cada alvo, no entanto, tendo como padrão-ouro a cPCR. Nesse novo cálculo, a qPCR para o alvo 18S rDNA foi mais sensível, apresentando 93% de amostras positivas. Já a qPCR para o alvo HSP70 teve 77% de amostras positivas e a microscopia apresentou 75%. Considerando a especificidade, a microscopia se mostrou mais específica tendo como padrão-ouro a cPCR, com 88% de amostras verdadeiro-negativas, enquanto a qPCR para o HSP70 apresentou 71% e a qPCR para o 18S rDNA, 35% (Tabela 4.9).

Tabela 4.8: Sensibilidade e especificidade da detecção de *Leishmania* por PCR convencional ou quantitativo, em relação à microscopia óptica, em amostras de escova cervical de pacientes de Rondônia, Brasil.

Alvos/ Método		Amostras de pacientes (n=92)		
		Microscopia + (N=58)	Microscopia - (N=34)	Total
HSP70	cPCR +	56 (97%)	19 (56%)	75
	cPCR -	2 (3%)	15 (44%)	17
HSP70	qPCR +	49 (84%)	14 (41%)	63
	qPCR -	9 (16%)	20 (59%)	29
18S rDNA	qPCR +	53 (91%)	28 (82%)	81
	qPCR -	5 (9%)	6 (18%)	11

Microscopia + = positivo na microscopia; Microscopia - = negativo na microscopia; cPCR + = positivo na PCR convencional; cPCR - = negativo na PCR convencional; qPCR + = positivo no PCR quantitativo; qPCR - = negativo no PCR quantitativo.

Tabela 4.9: Sensibilidade e especificidade da detecção de *Leishmania* por microscopia ou PCR quantitativo, em relação à PCR convencional, em amostras de escova cervical de pacientes de Rondônia, Brasil.

Alvos/ Método		Amostras de pacientes (n=92)		
		cPCR HSP70 + (N=75)	cPCR HSP70 - (N=17)	Total
	Microscopia +	56 (75%)	2 (12%)	58
	Microscopia -	19 (25%)	15 (88%)	34
HSP70	qPCR +	58 (77%)	5 (29%)	63
	qPCR -	17 (23%)	12 (71%)	29
18S rDNA	qPCR +	70 (93%)	11 (65%)	81

	<b>qPCR -</b>	5 (7%)	6 (35%)	11
--	---------------	--------	---------	----

cPCR + = positivo na PCR convencional; cPCR - = negativo na PCR convencional; Microscopia + = positivo na microscopia; Microscopia - = negativo na microscopia; qPCR + = positivo no PCR quantitativo; qPCR - = negativo no PCR quantitativo.

A análise estatística de concordância por Bland-Altman apontou que ambos os alvos testados apresentaram boa concordância (Figura 4.4). Isso indica que o HSP70 pode ser validado como um alvo a ser usado para a quantificação de amostras clínicas, obtendo-se com ele uma quantificação precisa e confiável, considerando a maior especificidade desse alvo.

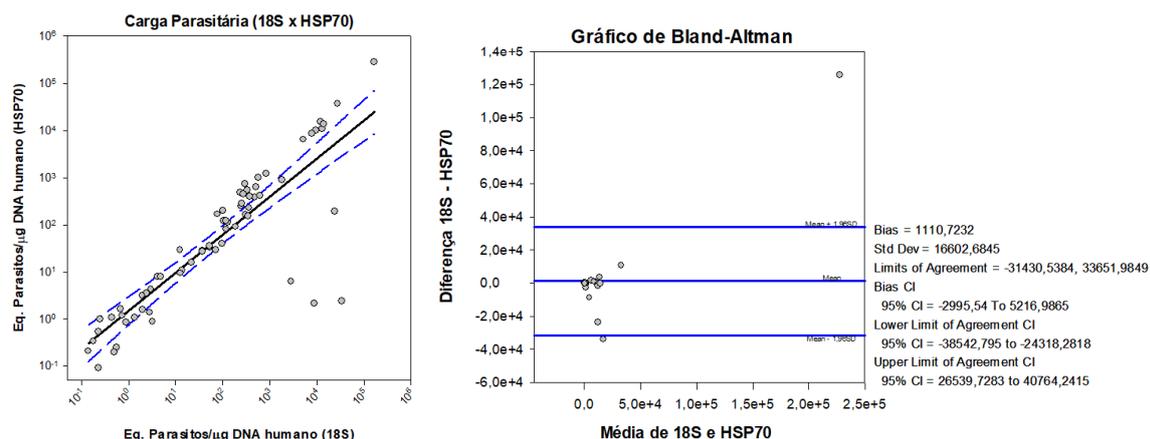


Figura 4.4: Ensaio de concordância de Bland-Altman: avaliação da concordância entre as metodologias de quantificação da carga parasitária de *Leishmania*, em amostras de escova cervical de pacientes de Rondônia - Brasil, pelos dois alvos estudados (HSP70 e 18S rDNA).

## 4.2 HRM

### 4.2.1 HSP70 c

#### 4.2.1.1 Padronização

Diferentes concentrações de iniciadores e DNA foram testadas, sendo os melhores resultados obtidos com a concentração de 0,6 pmol/μL de cada iniciador e 150 ng/μL de DNA (Quadro 4.1).

Quadro 4.1: Diferentes concentrações de DNA de *Leishmania* e iniciadores testados para o alvo HSP70, com a concentração definida para ser utilizada nas próximas reações indicada em negrito.

DNA	INICIADORES				
100 ng/μL	0,1 pmol/μL	0,2 pmol/μL	0,4 pmol/μL	<b>0,6 pmol/μL</b>	0,8 pmol/μL
150 ng/μL					

Após a padronização com os iniciadores HSP70 c (Graça *et al.* 2012) e com as cepas de referência da CLIOC, foi possível diferenciar apenas as Euleishmanias (representadas pelos subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*) das Paraleishmanias (Cupolillo *et al.*, 2000), representadas nesses experimentos pelas cepas IOCL 1245 (*L. colombiensis*), IOCL 888 (*L. equatorensis*) e IOCL 582 (*L. hertigi*), não sendo possível distinguir as diferentes espécies dos dois subgêneros de *Leishmania*. As cepas foram agrupadas em 04 padrões observados nas curvas de dissociação obtidas por HRM (Tabela 4.10 e Figura 4.5). Os padrões se mantiveram em quatro repetições experimentais, demonstrando a reprodutibilidade da técnica. Esse resultado representou a primeira etapa para a construção de um algoritmo para a diferenciação de espécies de *Leishmania* por HRM.

Tabela 4.10: Espécies de *Leishmania* analisadas por *High Resolution Melting* com os iniciadores HSP70 c e os padrões observados.

Amostra	Espécie	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4
IOCL 561	<i>L. (L.) mexicana</i>	X			
IOCL 563	<i>L. (L.) donovani</i>	X			
IOCL 565	<i>L. (V.) guyanensis</i>	X			
IOCL 566	<i>L. (V.) braziliensis</i>	X			
IOCL 575	<i>L. (L.) amazonensis</i>	X			
IOCL 579	<i>L. (L.) infantum</i>	X			
IOCL 581	<i>L. (L.) major</i>	X			
IOCL 1365	<i>L. (V.) naiffi</i>	X			
IOCL 1545	<i>L. (V.) shawi</i>	X			
IOCL 2821	<i>L. (L.) major</i>	X			
IOCL 2906	<i>L. (L.) infantum</i>	X			
IOCL 1023	<i>L. (V.) lainsoni</i>		X		
IOCL 571	<i>L. (L.) tropica</i>		X		
IOCL 582	<i>L. hertigi</i>			X	
IOCL 888	<i>L. equatorensis</i>				X
IOCL 1245	<i>L. colombiensis</i>				X

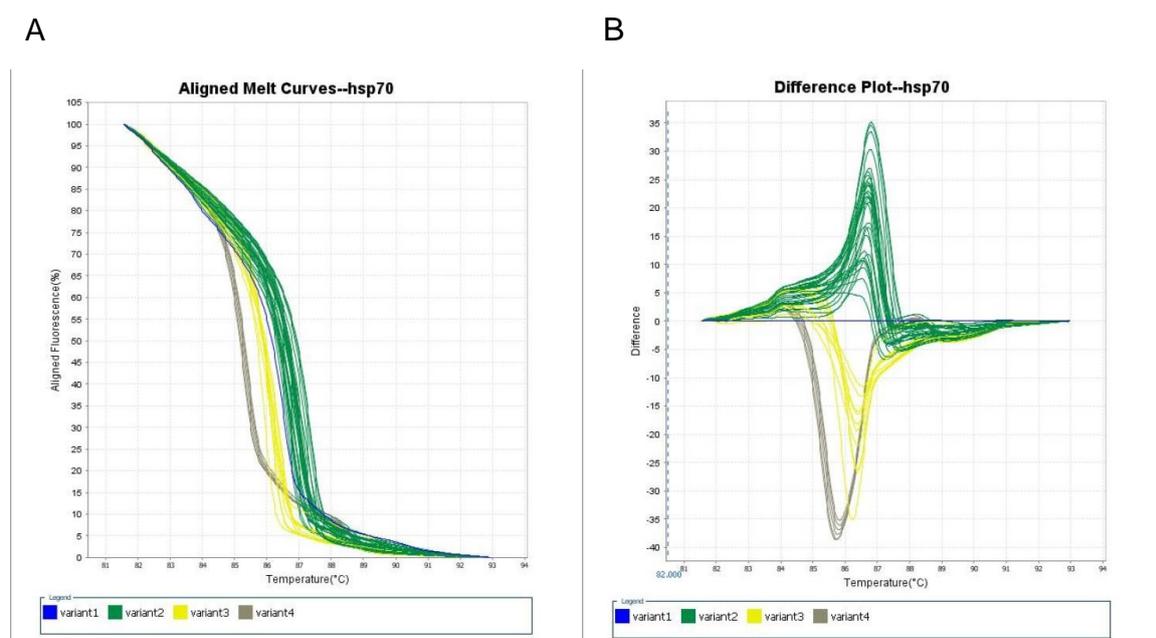


Figura 4.5: Perfis das curvas de dissociação (A) e gráfico das diferenças (B) das cepas de referência da CLIOC para o alvo HSP70, com os iniciadores HSP70 c.

#### 4.2.2 Reprodução dos protocolos descritos por Zampieri *et al.* 2016

Considerando os resultados obtidos com os iniciadores HSP70 c (Graça *et al.* 2012), os quais não permitiram a diferenciação ao nível de espécie de *Leishmania*, e, considerando também os resultados obtidos por Zampieri e colaboradores em 2016, os quais foram promissores na diferenciação de espécies por HRM com iniciadores para o alvo HSP70, reproduzimos esses protocolos, com um maior número de cepas e posteriormente com amostras clínicas de pacientes diagnosticados com leishmaniose.

##### 4.2.2.1 Padronização

Com isso, primeiramente foram reproduzidos esses protocolos para ambos os iniciadores descritos, iniciador 1 (HSP70 F2 e HSP70 c R) para todas as espécies, e iniciador 2 (HSP70 F1 e HSP70 R1) para *L. Viannia* (Tabela 3.1), com as cepas de referência da CLIOC (Anexo 1). Os resultados desses experimentos com o nosso painel de cepas de referência corroboraram o resultado descrito por Zampieri, sendo possível diferenciar as mesmas espécies com os mesmos iniciadores.

Para o iniciador 1, além das espécies de *Leishmania* utilizadas por Zampieri (*L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*), foram incluídas espécies de Paraleishmania (*L. hertigi*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis*) e foi possível diferenciar as mesmas espécies que Zampieri, com exceção de *L. naiffi* e *L. shawi*, que ficaram agrupadas na mesma variante nos nossos experimentos. Já as Paraleishmanias, ficaram divididas em duas variantes (Tabela 4.11).

Para o iniciador 2, foram usadas somente as cepas de referência da CLIOC pertencentes ao subgênero *L. Viannia* (*L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*), que correspondem às mesmas espécies testadas por Zampieri. Os resultados dos nossos experimentos novamente corroboraram o resultado apresentado por Zampieri, sendo as mesmas espécies agrupadas nas mesmas variantes (Tabela 4.11). A combinação dos dois iniciadores permite a distinção das espécies de *L. (Viannia)* (Figuras 4.6, 4.7 e 4.8).

Tabela 4.11: Resultados dos experimentos para os iniciadores 1 e 2 com as respectivas cepas utilizadas.

<b>Amostra</b>	<b>Espécie</b>	<b>Variante Iniciador 1</b>	<b>Variante Iniciador 2</b>
IOCL 561	<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	1A	-
IOCL 563	<i>L. (Leishmania) donovani</i>	1A	-
IOCL 575	<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 579	<i>L. (Leishmania) infantum</i>	1A	-
IOCL 1023	<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	1A	2A
IOCL 2906	<i>L. (Leishmania) infantum</i>	1A	-
IOCL 571	<i>L. (Leishmania) tropica</i>	1B	-
IOCL 582	<i>L. hertigi</i>	1B	-
IOCL 1245	<i>L. colombiensis</i>	1C	-
IOCL 888	<i>L. equatorensis</i>	1C	-
IOCL 565	<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 566	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 581	<i>L. (Leishmania) major</i>	1D	-
IOCL 2821	<i>L. (Leishmania) major</i>	1D	-
IOCL 1365	<i>L. (Viannia) naiffi</i>	1E	2B
IOCL 1545	<i>L. (Viannia) shawi</i>	1E	2A

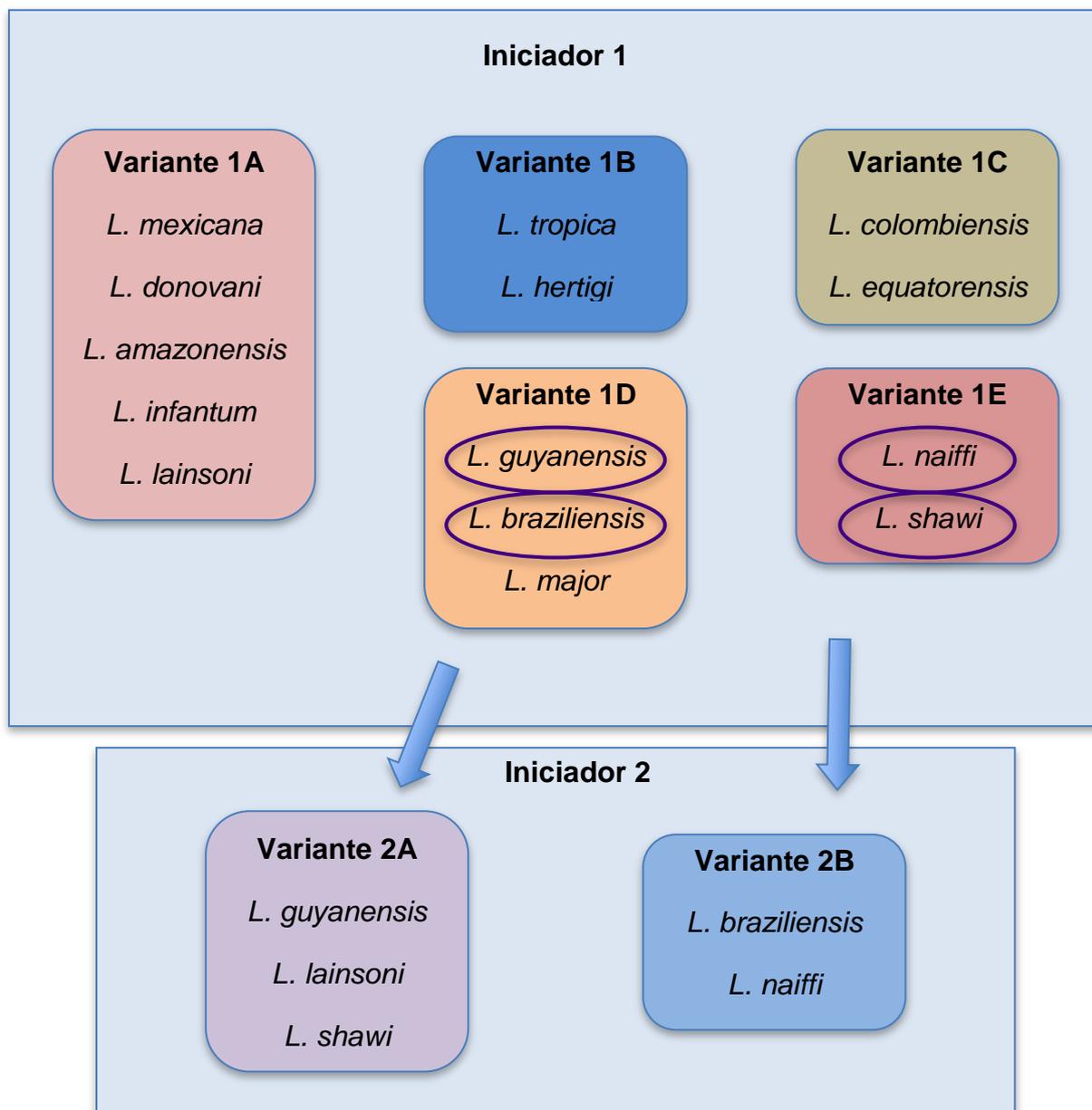


Figura 4.6: Variantes nas quais as espécies de *Leishmania* ficaram agrupadas com os iniciadores 1 e 2. Variantes 1 (A, B, C, D e E) representam as obtidas com o iniciador 1 e variantes 2 (A e B) representam as obtidas com o iniciador 2.

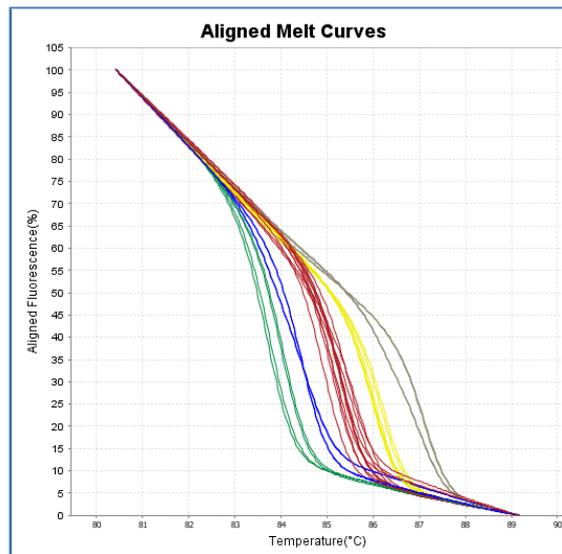


Figura 4.7: Padrões de referências obtidas para o iniciador 1 com suas respectivas curvas de dissociação alinhadas nas diferentes variantes detectadas. Curvas em verde - variante 1A; Curvas em azul - variante 1B; Curvas em vermelho - variante 1C; Curvas em amarelo - 1D; Curvas em cinza - variante 1E.

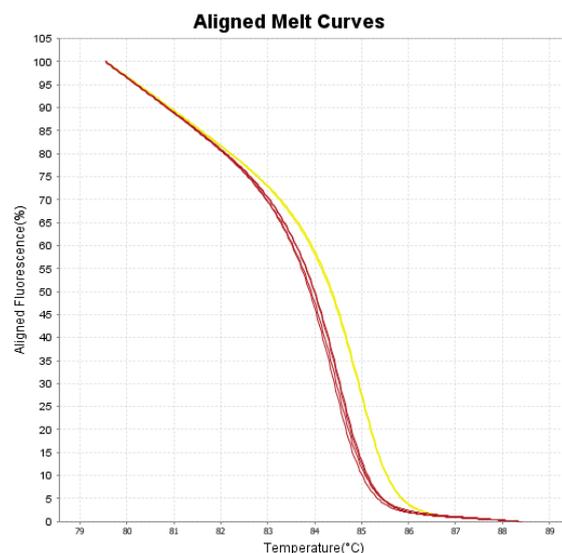


Figura 4.8: Padrões de referências obtidas para o iniciador 2 com suas respectivas curvas de dissociação alinhadas nas diferentes variantes detectadas. Curvas em vermelho - variante 2A; Curvas em amarelo - variante 2B.

#### 4.2.2.2 Validação com cepas de promastigotas

Ao compararmos os resultados das duas padronizações detectou-se o maior potencial para separação de cepas utilizando os iniciadores de Zampieri *et al.*, 2016. Diante disso os experimentos seguintes foram feitos apenas para esses iniciadores.

Após a obtenção desses dados, foi selecionado um painel de 97 cepas, de diferentes regiões do Brasil, cobrindo principalmente a região Amazônica que compreende a maior diversidade de espécies de *Leishmania* que circulam no Brasil. Essas cepas foram submetidas às reações de HRM já padronizadas para os iniciadores 1 e 2. Todas as cepas selecionadas para esse painel foram previamente caracterizadas por PCR e sequenciamento do alvo HSP70 P1 (Garcia *et al.* 2004).

Com ambos os iniciadores, de um total de 97 cepas testadas, cinco não corresponderam à caracterização prévia, duas com o iniciador 1 e três com iniciador 2, indicando o potencial desta técnica para a diferenciação de espécies de *Leishmania* provenientes de amostras de cultura. As amostras que não corresponderam estão marcadas em negrito. Além disso, com o iniciador 2, não foi possível obter amplificação para 14 das 97 cepas (Tabela 4.12).

Tabela 4.12: Painel de cepas testadas para os iniciadores 1 e 2, e suas respectivas variantes. \*Cepas que não corresponderam na variante à caracterização prévia. SA = cepas que não amplificaram.

<b>Amostras</b>	<b>Espécie</b>	<b>Variante Iniciador 1</b>	<b>Variante Iniciador 2</b>
IOCL 262	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 322	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 577	<i>L. (L.) mexicana</i>	1A	-
IOCL 615	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 897	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 1043	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 1071	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-

IOCL 1109	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 2430	<i>L. (L.) infantum</i>	1A	-
IOCL 2490	<i>Leishmania sp. Ll e Ln</i>	1A	2A
IOCL 2497	<i>L. (V.) lainsoni</i>	1A	2A
IOCL 2571	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 2586	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 2647	<i>L. (L.) infantum</i>	1A	-
IOCL 2679	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 2690	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	1A	SA
IOCL 2704	<i>L. (L.) infantum</i>	1A	-
IOCL 2740	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 3059	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 3212	<i>L. (L.) infantum</i>	1A	-
IOCL 3281	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
<b>IOCL 3310*</b>	<b><i>L. (V.) naiffi</i></b>	<b>1A</b>	<b>2A</b>
IOCL 3311	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 3315	<i>L. Viannia lainsoni</i>	1A	SA
IOCL 3352	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 3399	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 3534	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 3535	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	-
IOCL 3572	<i>L. (L.) mexicana</i>	1A	-
<b>IOCL 161*</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>1D</b>	<b>2A</b>
IOCL 166	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
<b>IOCL 167*</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>1D</b>	<b>2A</b>
IOCL 390	<i>Leishmania sp. Lb e Lg</i>	1D	2B
IOCL 849	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 1731	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 1734	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
<b>IOCL 1851*</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>1D</b>	<b>2A</b>
IOCL 1917	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2130	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B

IOCL 2134	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2139	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2160	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2188	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2287	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2288	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2291	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 2292	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 2335	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 2337	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 2344	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2356	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 2371	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 2405	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 2429	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2495	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2501	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2502	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2538	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2660	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 2689	<i>L. (V.) utingensis</i>	1D	2B
IOCL 2693	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2823	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2824	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2842	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 2939	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 3011	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3061	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3062	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3141	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3162	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 3163	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA

IOCL 3229	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3231	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3305	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 3306	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
<b>IOCL 3307*</b>	<b><i>L. (L.) amazonensis</i></b>	<b>1D</b>	-
IOCL 3312	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	SA
IOCL 3314	<i>L. (V.) braziliensis</i>	SA	SA
IOCL 3327	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 3358	<i>Leishmania sp. Lb e Lg</i>	1D	2A
IOCL 3360	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3362	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 3390	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 3394	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3397	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	SA
IOCL 3538	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	2A
IOCL 3669	<i>L. (V.) panamensis</i>	1D	2A
IOCL 3657	<i>L. (V.) peruviana</i>	1D	2B
IOCL 3662	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3661	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3665	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	2B
IOCL 3353	<i>L. (V.) shawi</i>	1E	2A
IOCL 3523	<i>L. (V.) naiffi</i>	1E	2A
IOCL 3524	<i>L. (V.) naiffi</i>	1E	2B
IOCL 3541	<i>L. (V.) naiffi</i>	1E	2B

#### 4.2.2.3 Sequenciamento

Das 97 cepas utilizadas para o HRM, 56 foram submetidas com sucesso ao sequenciamento do alvo HSP70 P1 (Garcia *et al.* 2004) [Tabela 3.1], incluindo as quais o resultado obtido no HRM não correspondeu à caracterização prévia. Dessas, cinco cepas tiveram a caracterização prévia confirmada pelo resultado do sequenciamento, discordando de fato do resultado do HRM. Os fragmentos alinhados referentes às regiões amplificadas com os iniciadores 1 e 2 estão representados nas tabelas 4.13 e 4.14. Os perfis das curvas de dissociação das cepas que não corresponderam à caracterização prévia, e também à sua confirmação por sequenciamento e busca na plataforma BLAST (ncbi.gov), para cada iniciador, estão representados nas figuras 4.9-4.13.



Tabela 4.14: Polimorfismos encontrados para a região amplificada do iniciador 2 para algumas das cepas submetidas ao HRM.

Amostra	Variante	C	A	C	A	T	G	G	G	G	A	A	G	G	C	C	T	Tm
IOCL 566 L. braziliensis	2B	C	A	C	A	T	G	G	G	G	A	A	G	G	C	C	T	84,768
IOCL 161 L. braziliensis	2A	C	A	C	A	T	G	C	.	.	T	.	.	T	T	T	.	84,535
IOCL 167 L. braziliensis	2A	C	A	C	A	T	G	C	.	.	T	C	C	T	T	.	.	84,535
IOCL 1731 L. braziliensis	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,924
IOCL 1851 L. braziliensis	2A	C	A	C	A	T	G	.	T	.	C	C	.	C	.	.	C	84,457
IOCL 2160 L. braziliensis	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,963
IOCL 3662 L. braziliensis	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,924
IOCL 3661 L. braziliensis	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,885
IOCL 3665 L. braziliensis	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,885
IOCL 565 L. guyanensis	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	84,457
IOCL 390 L. guyanensis/L. braziliensis	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	T	T	.	C	.	T	C	84,768
IOCL 2939 L. guyanensis	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	84,534
IOCL 3305 L. guyanensis	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	84,418
IOCL 1023 L. lainsoni	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	84,184
IOCL 1365 L. naiffi	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,963
IOCL 3310 L. naiffi	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,495
IOCL 3669 L. panamensis	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	84,496
IOCL 3657 L. peruviana	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	84,963
IOCL 1545 L. shawi	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	84,106
IOCL 3353 L. shawi	2A	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	83,988
IOCL 2689 L. utingensis	2B	C	A	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	84,963

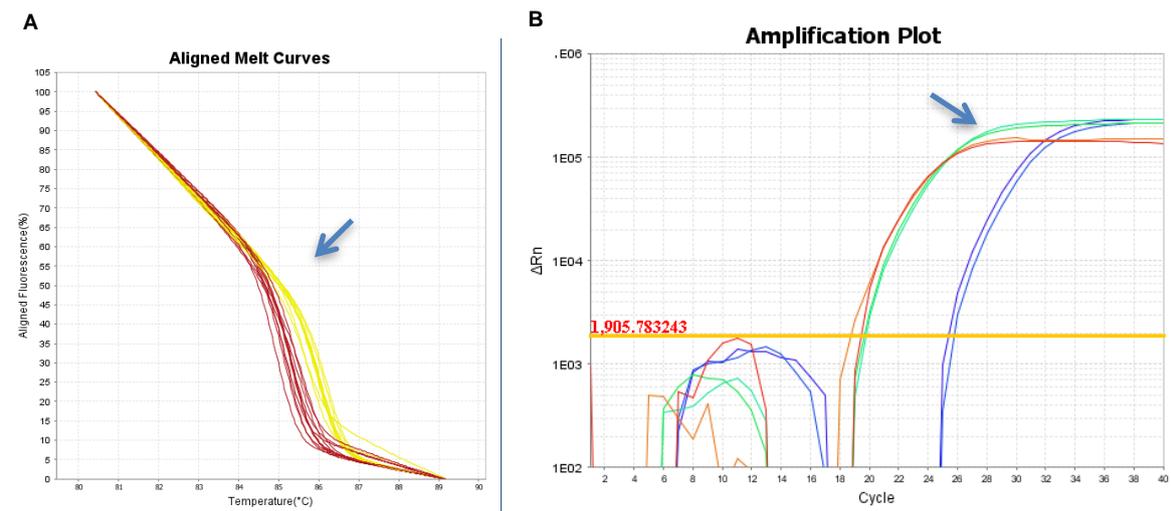


Figura 4.9: A: Perfil da curva de dissociação da cepa IOCL 3307, obtido com o iniciador 1 (seta). A figura mostra esta cepa agrupada na variante 1D, representada em amarelo. B: Perfil da curva de amplificação para a mesma amostra, indicado pela seta. Em laranja a curva de amplificação da cepa de referência IOCL 566 (*L. (V.) braziliensis*) e em azul da cepa de referência IOCL 575 (*L. (V.) amazonensis*).

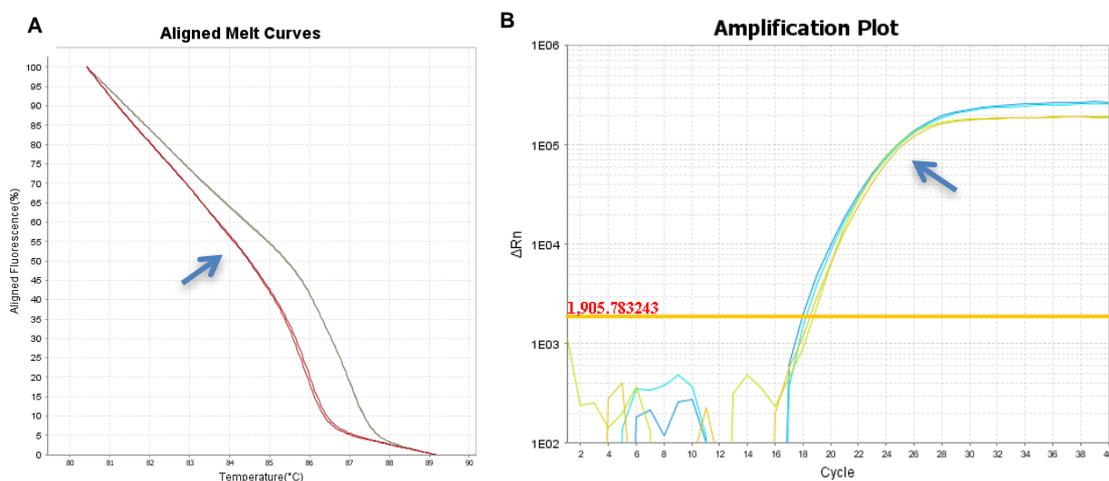


Figura 4.10: A: Perfil da curva de dissociação da cepa IOCL 3310, obtido com o iniciador 1 (seta). A figura mostra esta cepa agrupada na variante 1A, representada em vermelho, e a curva de dissociação da cepa de referência IOCL 1365 (*L. (V.) naiffi*) representada em cinza. B: Perfil da curva de amplificação para a mesma amostra, indicado pela seta. Em azul a curva de amplificação da cepa de referência IOCL 1365 (*L. (V.) naiffi*).

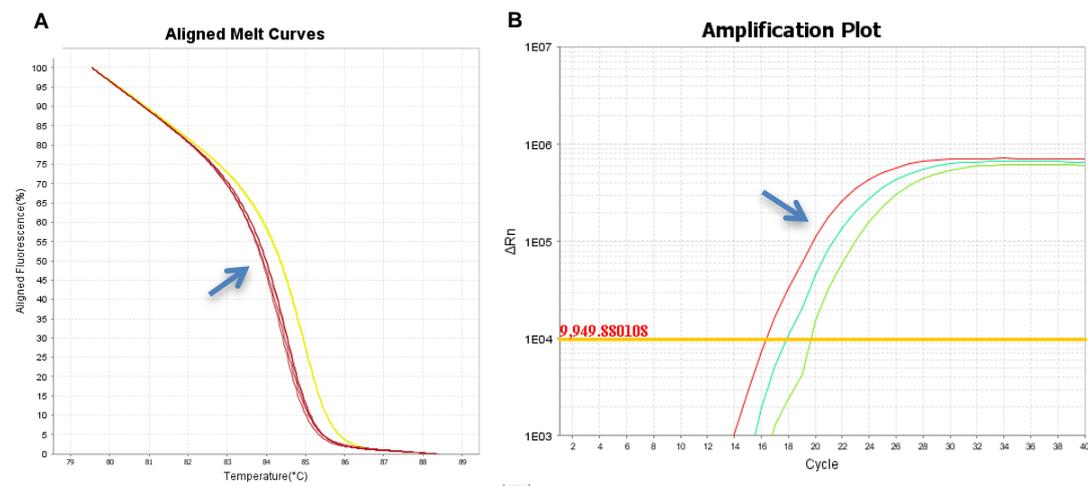


Figura 4.11: A: Perfil da curva de dissociação da cepa IOCL 161, obtido com o iniciador 2 (seta). A figura mostra esta cepa agrupada na variante 2A, representada em vermelho. B: Perfil da curva de amplificação para a mesma amostra, indicado pela seta. Em azul claro, a curva de amplificação da cepa de referência IOCL 566 (*L. (V.) braziliensis*) e, em verde claro, da cepa de referência IOCL 565 (*L. (V.) guyanensis*).

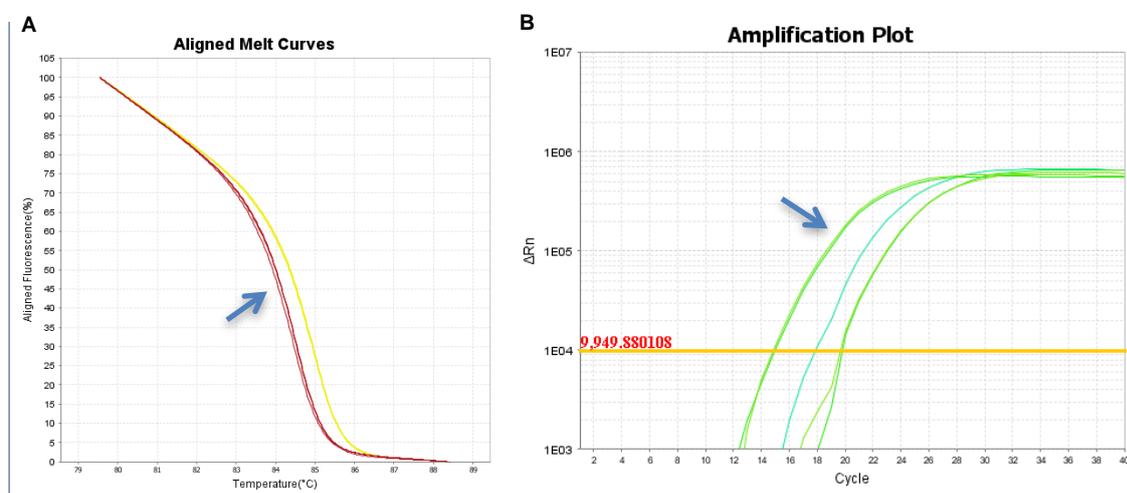


Figura 4.12: A: Perfil da curva de dissociação da cepa IOCL 167, obtido com o iniciador 2 (seta). A figura mostra esta cepa agrupada na variante 2A, representada em vermelho. B: Perfil da curva de amplificação para a mesma amostra, indicado pela seta. Em azul claro, a curva de amplificação da cepa de referência IOCL 566 (*L. (V.) braziliensis*) e, em verde claro, da cepa de referência IOCL 565 (*L. (V.) guyanensis*).

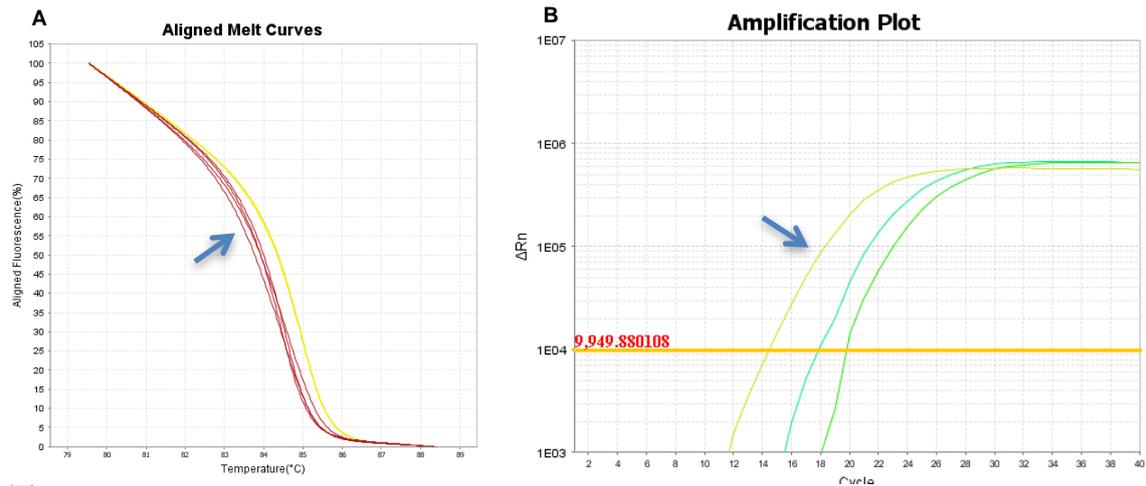


Figura 4.13: A: Perfil da curva de dissociação da cepa IOCL 1851, obtido com o iniciador 2 (seta). A figura mostra esta cepa agrupada na variante 2A, representada em vermelho. B: Perfil da curva de amplificação para a mesma amostra, indicado pela seta. Em azul claro, a curva de amplificação da cepa de referência IOCL 566 (*L. (V.) braziliensis*) e, em verde claro, da cepa de referência IOCL 565 (*L. (V.) guyanensis*).

#### 4.2.2.4 Ensaios de reprodutibilidade

Para verificar a reprodutibilidade dessa técnica, foram reproduzidos os protocolos para os iniciadores 1 e 2 com as cepas controles para cada um. Foram selecionadas para esses testes também algumas das cepas provenientes do estado de Rondônia, Brasil, que compunham o amplo painel de cepas testado, uma vez que essas cepas seriam utilizadas também como controles, além das referências, para a validação com amostras clínicas, afim de que haja uma boa representatividade dos possíveis perfis de curvas de dissociação circulantes naquela região.

Foi obtido 100% de reprodutibilidade nos resultados de dois experimentos (uma duplicata) realizados, em dias diferentes, nas mesmas condições para os iniciadores 1 e 2 (Tabela 4.15).

Tabela 4.15: Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para os iniciadores 1 e 2, com suas respectivas variantes, mostrando 100% de reprodutibilidade. Exp. 1 e 2: Experimentos 1 e 2 .

Amostras	Espécie	Iniciador 1		Iniciador 2	
		Variante Exp.1	Variante Exp. 2	Variante Exp.1	Variante Exp. 2
IOCL 565	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	1D	2A	2A
IOCL 566	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	1D	2B	2B
IOCL 575	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	1A	-	-
IOCL 579	<i>L. (L.) infantum</i>	1A	1A	-	-
IOCL 1023	<i>L. (V.) lainsoni</i>	1A	1A	2A	2A
IOCL 1365	<i>L. (V.) naiffi</i>	1E	1E	2B	2B
IOCL 1545	<i>L. (V.) shawi</i>	1E	1E	2A	2A
IOCL 2689	<i>L. (V.) utingensis</i>	1E	1E	2B	2B
IOCL 2690	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	1D	1D	2A	2A
IOCL 3394	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1D	1D	2B	2B
IOCL 3398	<i>L. (V.) lainsoni</i>	1D	1D	2A	2A
IOCL 3399	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1A	1A	-	-
IOCL 3538	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1D	1D	2A	2A

#### 4.2.2.5 Validação com amostras de pacientes

Após a confirmação da reprodutibilidade da técnica e o estabelecimento das cepas a serem usadas como padrões, foi realizada a validação do HRM com amostras clínicas de pacientes provenientes de Rondônia, Brasil, previamente caracterizadas por RFLP para o alvo HSP70 (HSP70 c). De um total de 66 amostras validadas, 16 foram divergentes da sua caracterização prévia, 15 apresentaram resultados inconclusivos e 10 amostras foram negativas (Tabela 4.16). Além disso, três amostras negativas por PCR convencional (cPCR) e microscopia, foram positivas no HRM. Ainda assim, para 25 das 66 amostras validadas os resultados foram convergentes, indicando o potencial da técnica de HRM para o diagnóstico molecular rápido, que pode ser feito diretamente a partir de amostras clínicas, para a então detecção e caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. No entanto, a etapa de validação de amostras clínicas com esta metodologia, ainda precisa ser aprimorada, principalmente em relação aos critérios envolvidos na análise.

Tabela 4.16: Resultado da validação do HRM com amostras clínicas de pacientes com leishmaniose cutânea, provenientes de Rondônia, Brasil, para os dois iniciadores, com suas respectivas variantes, valores de  $C_t$  e carga parasitária. SA: Sem amplificação. As amostras que não corresponderam à caracterização previa estão marcadas em negrito.

Número	cPCR HSP70	Caracterização cPCR e RFLP HSP70	Valores médios de $C_t$ Iniciador 1	Valores médios de $C_t$ Iniciador 2	Carga Normalizada (par/ $\mu$ g)	Variante HRM Iniciador 1	Variante HRM Iniciador 2	Resultado HRM
IOCL 565	-	<i>L. (V.) guyanensis</i>	24.35 $\pm$ 1.18	22,77 $\pm$ 0,63	-	1D	2A	<i>L. (V.) guyanensis</i>
IOCL 566	-	<i>L. (V.) braziliensis</i>	21.14 $\pm$ 1.57	20,37 $\pm$ 0,87	-	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
IOCL 575	-	<i>L. (L.) amazonensis</i>	26.88 $\pm$ 0.71	33,92 $\pm$ 0,42	-	1A	-	<i>L. (L.) amazonensis</i>
IOCL 579	-	<i>L. (L.) infantum</i>	21.37 $\pm$ 0.20	34,87 $\pm$ 0,04	-	1A	-	<i>L. (L.) infantum</i>
IOCL 1023	-	<i>L. (V.) lainsoni</i>	19.53 $\pm$ 2.69	17,78 $\pm$ 0,17	-	1A	2A	<i>L. (V.) lainsoni</i>
IOCL 1365	-	<i>L. (V.) naiffi</i>	20.17 $\pm$ 0.74	17,43 $\pm$ 0,15	-	1E	2B	<i>L. (V.) naiffi</i>

IOCL 1545	-	<i>L. (V.) shawi</i>	21.94 ± 0.58	20,29 ± 0,10	-	1E	2A	<i>L. (V.) shawi</i>
IOCL 2689	-	<i>L. (V.) utingensis</i>	21.23 ± 0.16	17,93 ± 0,28	-	1E	2B	<i>L. (V.) utingensis</i>
IOCL 2690	-	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	17.99 ± 0.74	17,11 ± 0,22	-	1D	2A	<i>L. (V.) lindenbergi</i>
IOCL 3394	-	<i>L. (V.) braziliensis</i>	17.48 ± 0.71	15,99 ± 0,01	-	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
IOCL 3538	-	<i>L. (V.) guyanensis</i>	22.24 ± 0.76	21,43 ± 0,76	-	1D	2A	<i>L. (V.) guyanensis</i>
388	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	SA	36,76 ± 0,07	0,86	SA	2A	INCONCLUSIVO
<b>389*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>36.03 ± 0.13</b>	<b>35,43 ± 0,36</b>	4,26	<b>1D</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>
396	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	27.94 ± 0.20	25,80 ± 0,12	11126,35	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>397*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>31.86 ± 7.69</b>	<b>35,67 ± 0,08</b>	7,91	<b>1D</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>

399	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	25.51 ± 0.70	24,76 ± 0,27	10168,61	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>400*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>31.06 ± 0.08</b>	<b>27,72 ± 0,13</b>	<b>6569,40</b>	<b>1E</b>	<b>2B</b>	<b><i>L. (V.) naiffi</i></b>
<b>402*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>35.66 ± 0.04</b>	<b>34,66 ± 0,81</b>	<b>29,72</b>	<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) lainsoni</i></b>
403	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	29.43 ± 0.07	33,68 ± 0,50	NEGATIVO	1A	V1	INCONCLUSIVO
404	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33.83 ± 0.86	36,98 ± 0,54	NEGATIVO	1A	V1	INCONCLUSIVO
405	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33.84 ± 0.15	31,97 ± 0,58	123,16	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
406	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	36,89 ± 0,44	NEGATIVO	SA	SA	NEGATIVO
408	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	34.80 ± 1.30	32,02 ± 0,31	112,34	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
409	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	SA	38,62 ± 1,82	0,34	SA	SA	NEGATIVO
411	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33.75 ± 0.46	36,00 ± 32,94	249,27	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
415	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	SA	35,61 ± 36,18	0,25	SA	2A	INCONCLUSIVO

417	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	35.85 ± 0.40	32,67 ± 0,03	33	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
418	NEGATIVO	NEGATIVO	31.24 ± 0.10	27,57 ± 0,07	200,22	1A	V1	INCONCLUSIVO
419	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33.62 ± 1.16	30,06 ± 0,08	547,74	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
422	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	37,20 ± 0,02	1,09	SA	2A	NEGATIVO
423	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	32.32 ± 0.44	30,00 ± 0,17	1001,87	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>424*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>	<b>22.14 ± 0.22</b>	<b>21,03 ± 0,09</b>	<b>290.531,23</b>	<b>1D</b>	<b>2B</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>
425	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	36,12 ± 0,32	1,57	SA	2A	NEGATIVO
426	NEGATIVO	NEGATIVO	37.37 ± 0.57	35,85 ± 0,98	7,91	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
427	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	32.89 ± 0.39	31,54 ± 0,77	486,60	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>

428	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	SA	3,56	SA	SA	NEGATIVO
429	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	37,56 ± 0,03	NEGATIVO	SA	V1	NEGATIVO
430	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	37,88	NEGATIVO	SA	SA	NEGATIVO
431	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	36,958	1	SA	2A	NEGATIVO
<b>436*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>	<b>31.66 ± 0.57</b>	<b>28,98 ± 0,09</b>	<b>390,68</b>	<b>1D</b>	<b>2B</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>
437	NEGATIVO	NEGATIVO	36.43 ± 0.05	34,05 ± 0,17	10,94	1D	V1	INCONCLUSIVO
439	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	32.77 ± 0.23	30,22 ± 0,21	169,79	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>441*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>	<b>32.25 ± 1.43</b>	<b>30,72 ± 2,01</b>	<b>647,05</b>	<b>1D</b>	<b>2B</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>
442	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33.76 ± 0.73	30,75 ± 0,09	167,63	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>443*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>35.29 ± 0.14</b>	<b>31,85 ± 0,40</b>	<b>28,36</b>	<b>1D</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>

446	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	24.39 ± 0.31	22,80 ± 0,43	37991,56	1D	V1	INCONCLUSIVO
447	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	30.69 ± 0.53	28,53 ± 0,15	420,12	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
448	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	30.87 ± 0.24	29,41 ± 0,01	744,21	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
449	NEGATIVO	NEGATIVO	37.79 ± 0.32	38,21 ± 1,05	NEGATIVO	V1	2A	NEGATIVO
450	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	34.03 ± 0.40	31,27 ± 0,17	91,25	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
451	POSITIVO	Não identificado	34.25 ± 0.09	31,56 ± 0,16	29,70	1D	2A	<i>L. (V.) guyanensis</i>
452	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	30.71 ± 0.04	28,91 ± 0,32	459,10	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>453*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>31.83 ± 0.21</b>	<b>30,20 ± 0,17</b>	<b>3,17</b>	<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) lainsoni</i></b>
454	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>	30.59 ± 0.59	28,12 ± 0,37	284,24	V1	V1	INCONCLUSIVO
<b>458*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) shawi</i></b>	<b>24.95 ± 6.41</b>	<b>27,64 ± 0,22</b>	<b>6,32</b>	<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) lainsoni</i></b>

459	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	32.65 ± 0.49	31,94 ± 0,22	27,60	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>460*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>32.36 ± 1.52</b>	<b>33,15 ± 0,46</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) lainsoni</i></b>
462	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33,49 ± 1,01	30,00 ± 0,39	122,58	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>464*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>36,27 ± 0,37</b>	<b>33,22 ± 1,25</b>	<b>0,88</b>	<b>1D</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>
466	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33,97 ± 0,45	30,29 ± 0,05	35,71	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
467	NEGATIVO	NEGATIVO	SA	35,80 ± 0,14	<b>NEGATIVO</b>	SA	SA	NEGATIVO
<b>468*</b>	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>	<b>32,50 ± 3,09</b>	<b>28,66 ± 0,24</b>	<b>81,36</b>	<b>1E</b>	<b>2B</b>	<b><i>L. (V.) naiffi</i></b>
472	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	SA	35,22 ± 0,29	0,20	SA	2A	INCONCLUSIVO
476	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	30,83 ± 0,46	27,92 ± 0,01	400,97	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
480	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	SA	32,64 ± 0,61	0,09	SA	V1	INCONCLUSIVO

482	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	31,43 ± 0,02	28,36 ± 0,05	230,64	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
489	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>	29,80 ± 1,20	28,53 ± 0,17	154,18	1D	2B	<i>L. (V.) braziliensis</i>
35*	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) shawi</i></b>	<b>30,99 ± 0,26</b>	<b>29,65 ± 0,02</b>	-	<b>1D</b>	<b>2B</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>
62	POSITIVO	<i>L. (V.) lainsoni</i>	26,01 ± 0,46	25,63 ± 0,14	-	1A	2A	<i>L. (V.) lainsoni</i>
104*	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) shawi</i></b>	<b>30,31 ± 2,07</b>	<b>30,01 ± 0,39</b>	-	<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b><i>L. (V.) lainsoni</i></b>
118	POSITIVO	Não identificado	26,42 ± 0,12	25,07 ± 0,18	-	V1	2B	INCONCLUSIVO
118M	POSITIVO	Não identificado	36,36 ± 0,00	25,57 ± 13,13	-	1D	2A	<i>L. (V.) guyanensis</i>
243*	<b>POSITIVO</b>	<b><i>L. (V.) lainsoni</i></b>	<b>29,42 ± 0,04</b>	<b>28,06 ± 0,27</b>	-	<b>1D</b>	<b>2B</b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b>
248	POSITIVO	<i>L. (V.) lainsoni</i>	SA	35,45 ± 0,28	-	SA	V1	INCONCLUSIVO
250	POSITIVO	<i>L. (V.) lainsoni</i>	22,85 ± 19,38	SA	-	1E	SA	INCONCLUSIVO

290	POSITIVO	<i>L. (V.) shawi</i>	SA	34,62 ± 0,40	-	SA	2B	INCONCLUSIVO
545	POSITIVO	Não identificado	35,45 ± 0,11	31,64 ± 0,72	-	1A	V1	INCONCLUSIVO

## 4.2.3 COI

### 4.2.3.1 Padronização

Para a padronização da reação para o alvo COI, foram testadas diferentes concentrações de iniciadores, sendo obtidos os melhores resultados a partir da concentração de 0,2 pmol/μL de cada iniciador, com os quatro iniciadores estudados (COI 129, COI 220, COI 367 e COI 428). As reações foram realizadas a partir da concentração de DNA já padronizada para o alvo HSP70, que foi de 150 ng/μL na reação (Quadro 4.2).

Quadro 4.2: Concentrações de iniciadores testadas para o alvo COI. Em negrito está indicada a concentração padronizada para as próximas reações.

DNA	INICIADORES				
150 ng/μL	0,1 pmol/μL	<b>0,2 pmol/μL</b>	0,3 pmol/μL	0,6 pmol/μL	0,9 pmol/μL

### 4.2.3.2 Teste dos iniciadores

Após a padronização das reações, os quatro iniciadores desenhados para o alvo COI foram testados para o seu propósito inicial de caracterização para determinadas espécies. Os iniciadores COI 220 e COI 367 foram eficientes no seu propósito inicial, sendo possível distinguir as espécies de *Leishmania* esperadas: *L. L. donovani* de *L. L. infantum*, além do que também foi possível diferenciar *L. L. tropica*, com o iniciador COI 220; e *L. V. panamensis* de *L. V. guyanensis* e *L. V. shawi*, com o iniciador COI 367 (Tabela 4.17 e Figura 4.14).

Considerando que com estes dois iniciadores foi possível caracterizar espécies muito similares e portanto muito difíceis de diferenciar, pode-se dizer que isso representa um importante dado para a construção de um algoritmo para diferenciar espécies de *Leishmania*, uma vez que com esses dois iniciadores foi possível resolver lacunas que ficaram em aberto com a utilização do alvo HSP70. A utilização desses dois alvos em combinação permite, então, a caracterização da grande maioria de espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem e, portanto, de grande importância médica.

Tabela 4.17: Iniciadores utilizados para o alvo COI, o objetivo para o qual foram desenhados e a representação se o objetivo foi atingido.

Iniciador	Com objetivo de diferenciar:	Perfis distintos
COI 220	<i>L. (L.) infantum</i>	Sim
	<i>L. (L.) donovani</i>	
COI 367	<i>L. (V.) panamensis</i>	Sim
	<i>L. (V.) guyanensis/L. (V.) shawi</i>	
COI 129	<i>L. (V.) naiffi</i>	Não
COI 428	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Não
	<i>L. (V.) shawi/L. (V.) panamensis</i>	

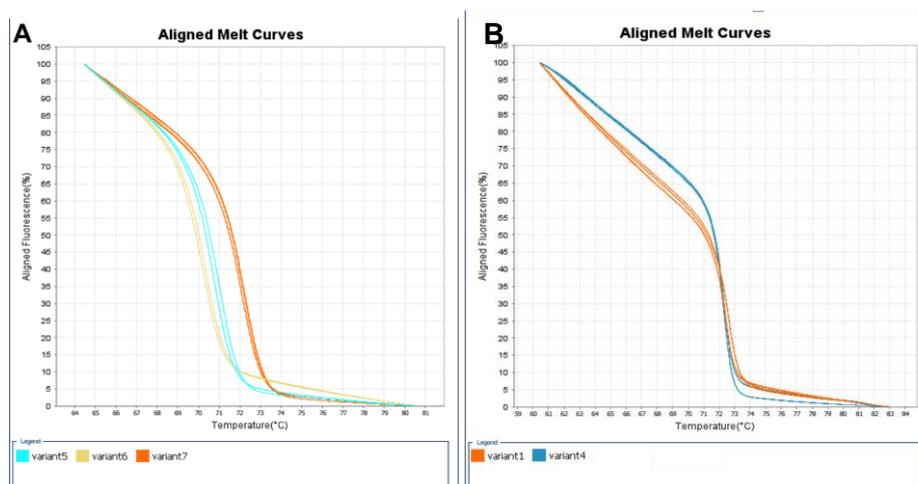


Figura 4.14: A: Curvas de dissociação alinhadas para o alvo COI 220 mostrando *L. L. donovani* (V5), *L. L. infantum* (V7), e *L. L. tropica* (V6), que estão representadas em variantes separadas. B: Curvas de dissociação alinhadas para o alvo COI 367 mostrando *L. V. panamensis* (V4), em uma variante separada de *L. V. guyanensis* (V1) e *L. V. shawi* (V1).

#### 4.2.4 Algoritmo para identificação de *Leishmania* por HRM

Com base nos resultados obtidos neste estudo, um algoritmo foi construído para a identificação de espécies de *Leishmania* por HRM (Figura 4.15), utilizando dois alvos moleculares: HSP70 e COI, a partir de dois iniciadores do HSP70 (descritos por Zampieri *et al.* 2016) e dois iniciadores específicos do COI, desenhados neste estudo. Primeiramente submete-se as amostras à reação de HRM com o iniciador 1 do alvo HSP70. Em seguida, se o resultado com o iniciador 1 for correspondente ao subgênero *L. (Viannia)*, utiliza-se o iniciador 2, também do HSP70. Para o caso do resultado obtido ficar entre *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*, utiliza-se o iniciador específico para o alvo COI (iniciador COI 220). E, por fim, se o resultado ficar entre *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*, é usado o iniciador do alvo COI específico (iniciador COI 367).

A utilização deste algoritmo permite a identificação da maioria das espécies causadoras das leishmanioses nas Américas.

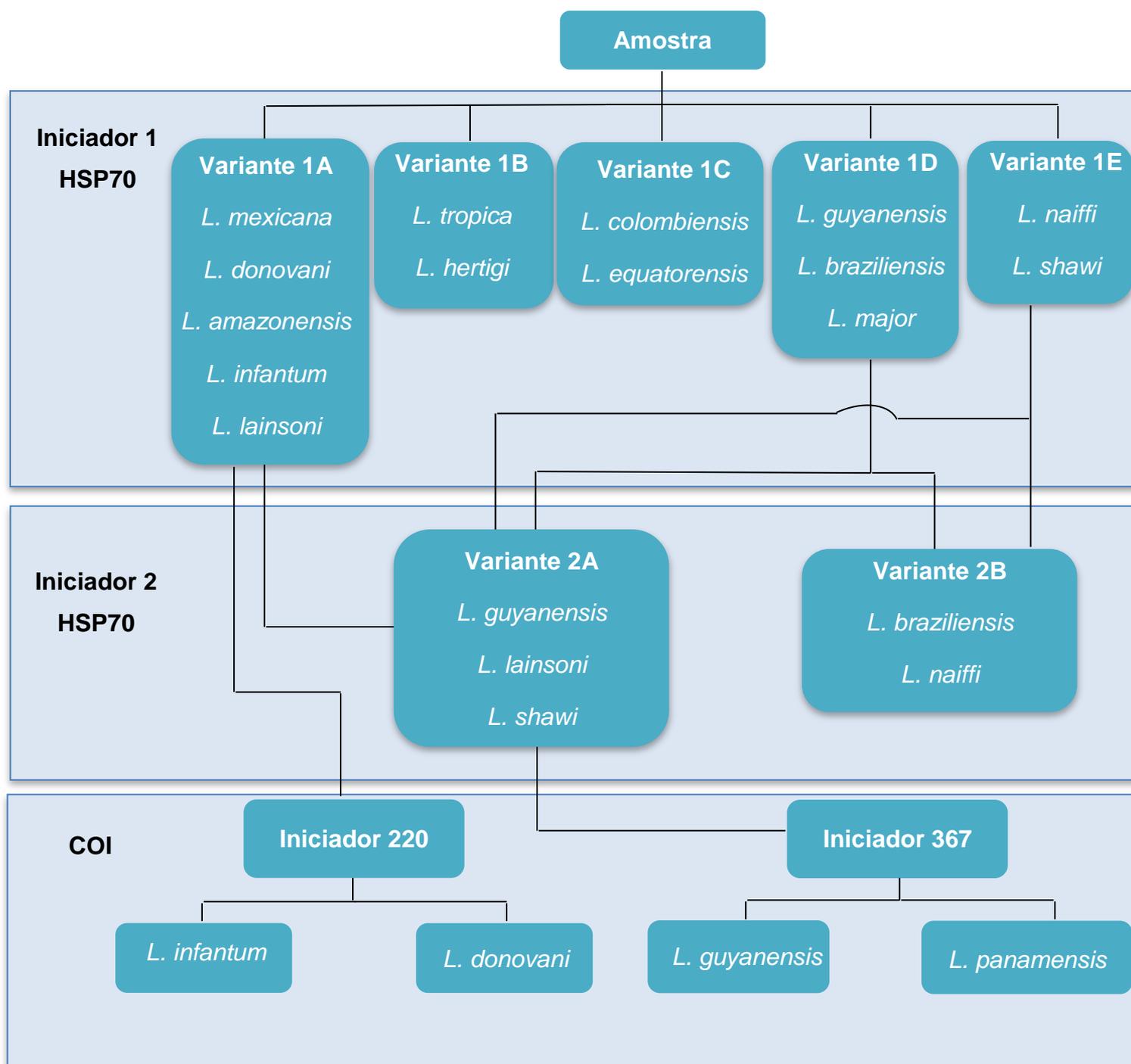


Figura 4.15: Algoritmo para a diferenciação de espécies de *Leishmania* por HRM utilizando primeiramente dois pares de iniciadores para o alvo HSP70, descritos por Zampieri *et al.* 2016, sendo o segundo específico para o subgênero *L. (Viannia)*. Em seguida, dois pares de iniciadores para o alvo COI, específicos para *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*, ou para *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*.

## 5. Discussão

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e avaliação das performances de metodologias moleculares para a detecção, quantificação e identificação de espécies de *Leishmania*, visando propor uma metodologia consenso a ser aplicada como ensaio de referência para diagnóstico e tipagem deste parasito. Assim, duas técnicas foram utilizadas, a qPCR e o HRM.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido empregada para determinar a carga parasitária da infecção no hospedeiro vertebrado (Nicolas *et al.*, 2002; Francino *et al.*, 2006; Solca Mda *et al.*, 2014), sendo útil não só para o diagnóstico como também para estudar a dinâmica da infecção e como marcador precoce do sucesso terapêutico. O HRM é uma técnica baseada em qPCR que permite a detecção de mutações, polimorfismos e diferenças epigenéticas em amostras de DNA, com grande potencial para diferenciar as espécies de *Leishmania*, inclusive a partir de amostras clínicas, dispensando o isolamento e cultivo do parasito (Taylor *et al.*, 2010<sup>b</sup>; Zampieri *et al.*, 2016). Entretanto, para ambas as técnicas, ainda não há um consenso em relação aos marcadores moleculares para o diagnóstico e para a genotipagem. Na busca pela padronização de diagnóstico para as leishmanioses, esses pontos precisam ser considerados.

No presente trabalho, durante a padronização das reações de qPCR, foi testado o limite de detecção de cada alvo estudado, o HSP70 e 18S rDNA. O limite de detecção obtido para o alvo HSP70 foi em torno de 100 parasitas por mL, enquanto que o obtido para o alvo 18S rDNA foi de 10 parasitas por mL, nos ensaios com parasitas cultivados. Este limite de detecção é menos sensível (em 01 log de diferença) do que alguns relatos na literatura (León *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2014), mas mais sensível do que outros (Hitakarun *et al.*, 2014). Apesar desta variação, as cepas, equipamentos, metodologia de extração de DNA e ciclagem foram as mesmas utilizadas no nosso estudo e nos estudos de León e colaboradores (2017) e Hernández e colaboradores (2014). O que variou foram os iniciadores e o sistema utilizado, sendo, portanto, esses os prováveis fatores responsáveis pelas diferenças nos valores de limite de detecção.

Porém, esperava-se no presente trabalho, uma maior sensibilidade, pois foi utilizado sistema TaqMan direcionado à uma região menor de ambos os genes (produtos amplificados de 163 e 155 pb para o HSP70 e 18SrDNA, respectivamente). Diante desse fato, seria esperada uma maior sensibilidade de detecção de *Leishmania* em baixas concentrações, já que as condições estabelecidas tendem a incrementar a eficiência da reação.

Contudo, um estudo comparando a acurácia de reações de qPCR com a utilização de SYBR Green e TaqMan relatou uma maior sensibilidade obtida com a utilização de SYBR Green em relação ao sistema TaqMan, tanto em amostras de biópsias de tecidos como em *swabs* (Gomes *et al.*, 2017). Assim, é possível que o sistema TaqMan apresente de fato menor sensibilidade, apesar de alguns relatos técnicos apontarem o inverso (Cao e Shockey, 2012). Mesmo com menor sensibilidade, as reações de quantificação utilizando o sistema TaqMan podem ser mais precisas e acuradas, uma vez que o mesmo minimiza a formação de dímeros de primers e possibilita a realização de reações em multiplex com o uso de controles endógenos, o que não é possível com a utilização de SYBR Green (Galluzzi *et al.*, 2018). No caso de pacientes humanos, um alvo muito utilizado para o controle interno da reação de amplificação é a RNase P. A inclusão de controles na reação em multiplex é fundamental para a quantificação absoluta da carga parasitária em amostras clínicas, pois permite a normalização da quantidade encontrada de parasitos pela quantidade de DNA proveniente da amostra, no caso, DNA humano, evitando assim resultados de diagnóstico falso-negativos (Moreira *et al.*, 2017). Além disso, o sistema de detecção/quantificação que utiliza sondas fluorogênicas (TaqMan) desenhadas para regiões internas das sequências que estão sendo amplificadas em tempo real, fornece uma maior especificidade, comparada ao uso de corantes fluorescentes (SYBR Green e outros) que intercalam inespecificamente na fita dupla do DNA (Galluzzi *et al.*, 2018).

O número de cópias do alvo HSP70 varia entre as diferentes espécies de *Leishmania*, apresentando poucas cópias no genoma - entre uma e 15 cópias dependendo da espécie (MacFarlane *et al.*, 1990; Bock and Langer, 1993; Zurita *et al.*, 2003; Folgueira *et al.*, 2007). No presente estudo, a curva-padrão para determinação da extensão dinâmica de detecção do alvo HSP70

foi realizada com *L. (V.) braziliensis*, que, considerando este alvo, apresenta sete cópias do gene em seu genoma (Ramírez *et al.*, 2011), o que pode ser considerado um baixo número de cópias quando comparada a outras espécies, como por exemplo, *L. (L.) donovani*, a qual apresenta de 12 a 15 cópias desse gene (MacFarlane *et al.*, 1990). O baixo número de cópias encontrado em *L. (V.) braziliensis* pode dificultar a detecção de concentrações muito baixas deste parasito, com o alvo HSP70, o que pode explicar o limite de detecção encontrado, de aproximadamente 100 parasitos/mL.

A técnica de qPCR se mostrou eficaz para a detecção da infecção por *Leishmania spp.*, sendo suficientemente sensível para detectar cinco células do parasito por amostra, utilizando o alvo que forneceu maior sensibilidade (18S rDNA). Esse achado era esperado devido ao maior número de cópias deste alvo no genoma (Guillaume *et al.*, 1992). No entanto, o 18S rDNA se mostrou menos específico, possibilitando a detecção de outros tripanosomatídeos quando comparado ao alvo HSP70 (Tabela 4.5), o que discorda de dados já publicados (León *et al.*, 2017; Hitakarun *et al.*, 2014), em que não foi observada amplificação para outras espécies não-leishmania com o alvo 18S rDNA. Uma possível explicação seria a utilização de diferentes iniciadores para este alvo, amplificando assim diferentes regiões deste mesmo gene. É possível que a região utilizada para anelamento dos iniciadores no presente estudo seja mais conservada entre os tripanosomatídeos, quando comparada à região de anelamento dos iniciadores utilizados por León e colaboradores, permitindo assim a amplificação de outras espécies de tripanosomatídeos (León *et al.*, 2017).

O alvo HSP70, apesar da menor sensibilidade quando comparado ao 18S rDNA, foi mais específico em todos os ensaios realizados, e, na amplificação de amostras clínicas, apresentou valores de  $C_t$  similares - em sua maioria - aos obtidos na amplificação das mesmas amostras com o 18S rDNA. Este fato corrobora os dados de León e colaboradores, se mostrando assim um bom alvo a ser utilizado para a quantificação de amostras clínicas de pacientes com LTA (León *et al.*, 2017).

Após os ensaios de linearidade, sensibilidade e especificidade, foram realizadas a amplificação e quantificação da carga parasitária em amostras

de DNA de 92 pacientes com suspeita de LTA, provenientes do Laboratório de Epidemiologia Genética da Fiocruz de Rondônia. Das 92 amostras, 63 foram positivas e 29 foram negativas para o alvo HSP70, enquanto que para o alvo 18S rDNA 81 foram positivas e 11 foram negativas, confirmando a maior sensibilidade do alvo 18S rDNA.

Dentre as metodologias de diagnóstico para as leishmanioses, a mais utilizada na rotina dos laboratórios clínicos e que é considerada o método-ouro para diagnóstico, segundo a Organização Mundial da Saúde, é a microscopia. No entanto, apesar dessa metodologia apresentar uma alta especificidade, sua sensibilidade é baixa, como demonstrado nas análises de sensibilidade e especificidade. Além disso, sua sensibilidade é muito variável, entre 74,4 e 40%, segundo dados da literatura (Bensoussan *et al.*, 2006; Szargiki *et al.*, 2009; Goto e Lauletta Lindoso, 2012). Com isso, métodos mais sensíveis como a PCR e a qPCR têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania*. Diversos protocolos de qPCR têm sido desenvolvidos para essa finalidade, sendo os alvos mais utilizados para detecção de *Leishmania*, o kDNA, que apresenta uma sensibilidade em torno de 97% (Jara *et al.*, 2013), o HSP70, com uma sensibilidade de 95% (Garcia *et al.*, 2007) e o 18S rDNA, apresentando valores similares ao kDNA, em torno de 97% (Adams *et al.*, 2014).

Apesar da maior sensibilidade da qPCR (Bensoussan *et al.*, 2006; Schönian, 2010; da Graça *et al.*, 2012; Koltas *et al.*, 2016), no presente estudo observamos um dado controverso. A cPCR para o alvo HSP70 foi mais sensível (tendo como padrão-ouro a microscopia) do que a qPCR para ambos os alvos, sendo que o 18S foi mais sensível em valores absolutos que o HSP70. Por outro lado, o 18S rDNA apresentou maior percentual de verdadeiros positivos e menor percentual de verdadeiros negativos. Esses resultados são esperados considerando as características deste alvo, i.e., maior número de cópias distribuídas no genoma e menor especificidade, resultante da maior conservação de sequência em diferentes espécies de tripanosomatídeos. Como já citado, a sensibilidade da microscopia é variável, dependendo do procedimento e da região de coleta do material (Bensoussan *et al.*, 2006; Szargiki *et al.*, 2009; Goto e Lauletta Lindoso, 2012), assim como da experiência do profissional para a leitura das lâminas. No presente

trabalho não tivemos acesso às lâminas, recebemos apenas o laudo da leitura das mesmas.

Foram também observadas quatro amostras negativas na qPCR para ambos os alvos e positivas para microscopia e cPCR. Esse caso específico pode ter ocorrido devido à qualidade do DNA utilizado, visto que recebemos esse material já pronto para as reações, não sendo realizadas por nós as etapas de extração e quantificação do mesmo. O DNA utilizado passou por um processo de transporte e estocagem, sendo por isso possivelmente submetido a sucessivos congelamentos e descongelamentos até que fosse utilizado, o que também pode ter contribuído para uma possível degradação.

Analisando os percentuais de positividade de todas as metodologias comparadas à cPCR como padrão-ouro, o qPCR para o alvo 18S rDNA foi a metodologia mais sensível, com 94% de amostras positivas, frente a 77% com o alvo HSP70. Apesar disso, de um total de 15 amostras negativas tanto por microscopia quanto por cPCR, 10 foram positivas nas reações de qPCR em pelo menos um dos alvos usados. Esse dado reforça a maior sensibilidade da qPCR em relação a outras metodologias de diagnóstico, apontando também para as muitas variáveis envolvidas em um diagnóstico por microscopia.

Já com relação à especificidade, os baixos valores encontrados para a qPCR, tanto com HSP70 quanto com o 18S rDNA, quando a microscopia foi considerada como padrão-ouro, ou padrão de referência, refletem a imperfeição desse padrão de referência. Uma vez que a microscopia tem baixa sensibilidade, ela pode levar a um excesso de falsos negativos. Dessa forma, as reações de qPCR (HSP70 e 18S rDNA), que apresentam uma maior sensibilidade, conseguem detectar esses falsos negativos como positivos. Isso leva à uma baixa especificidade desses métodos, uma vez que eles são naturalmente mais sensíveis. Quando mudamos o padrão de referência e comparamos todas as metodologias tendo a cPCR como padrão-ouro, a especificidade das reações de qPCR para os dois alvos é maior. Isso reforça o problema de se usar a microscopia como padrão-ouro.

A partir dos resultados obtidos, foram calculados o número total de amostras positivas, de amostras verdadeiro-negativas, a mediana da carga parasitária, além das cargas máxima e mínima para os dois alvos. O alvo 18S

rDNA foi capaz de detectar 20 amostras positivas a mais do que o HSP70. Este fato era esperado devido ao seu maior número de cópias no genoma de *Leishmania* em comparação ao HSP70 (León *et al.*, 2017). Os valores de carga parasitária obtidos para os dois alvos, no geral, foram bastante similares para todas as amostras testadas, com exceção de quatro amostras (amostras 391, 394, 458 e 468) que apresentaram uma diferença significativa de carga parasitária entre os alvos, chegando a cerca de 23000 parasitos/mL a mais no 18S rDNA, o que pode ser explicado pela menor especificidade deste alvo, comparada ao HSP70. Ainda assim esses dados indicam uma boa concordância entre eles.

Após a obtenção das cargas parasitárias normalizadas e dos cálculos dos percentuais de positividade, com o objetivo de comparar os dois protocolos de quantificação da carga parasitária em amostras clínicas (pelo HSP70 e pelo 18S rDNA), foi utilizada a análise de Bland-Altman. Esse tipo de análise consiste na quantificação da concordância entre duas medições através da estimativa da diferença média e da construção de limites de concordância (Altman e Bland, 1983). Os limites de concordância são calculados utilizando a média e o desvio padrão das diferenças entre duas medições. Os resultados são representados graficamente. O gráfico resultante é um gráfico de dispersão XY, no qual o eixo Y mostra a diferença entre as duas medidas pareadas (A-B), e o eixo X representa a média das duas medidas  $((A+B)/2)$ . Um modelo ideal afirmaria que as medidas obtidas por um método ou por outro dariam exatamente os mesmos resultados, então, todas as diferenças seriam iguais a zero (Bland e Altman, 1999; Giavarina, 2015). Dessa forma, quanto mais próximo de zero for a média das diferenças, maior a concordância entre os métodos.

Ao aplicar a análise de Bland-Altman nos dados obtidos neste estudo, pode-se observar que a maioria das amostras (com exceção de quatro) ficaram agrupadas no eixo 0 no gráfico de Bland-Altman, como pode ser observado na figura 4.4. Isso significa que ambas as metodologias de quantificação apresentaram uma boa concordância. Esses dados reforçam o potencial do alvo HSP70 para a quantificação da carga parasitária por *Leishmania* em amostras de pacientes.

A metodologia de HRM é uma metodologia altamente sensível, capaz de diferenciar sequências de DNA muito próximas, inclusive sequências que diferenciam por um único polimorfismo, sendo capaz de produzir perfis diferentes da curva de dissociação, permitindo a diferenciação (Graham *et al.*, 2005).

Primeiramente, Ceccarelli e colaboradores avaliaram em seu estudo a diferenciação dos dois subgêneros de *Leishmania* por qPCR seguido pela análise da curva de dissociação do DNA. Foram analisadas sete cepas, sendo quatro do subgênero *Leishmania* e três do subgênero *Viannia*. Os resultados foram positivos quando associados os dados do qPCR com os da curva de dissociação e os valores de T<sub>m</sub>. Somente a análise por HRM apresentou uma pequena diferença entre os dois subgêneros, no entanto não foram obtidas diferenças significativas nos valores de T<sub>m</sub>. As análises de HRM foram realizadas em amostras de parasitos isolados de cães infectados na Itália central (Ceccarelli *et al.*, 2014).

Mais recentemente, um estudo realizado por Zampieri e colaboradores em 2016 revelou resultados bastante promissores, permitindo a diferenciação de espécies de *Leishmania* usando este método (Zampieri *et al.*, 2016). Com base nos iniciadores para o alvo HSP70 utilizados por Graça e colaboradores em 2012, foram desenhados dois iniciadores para a amplificação de produtos menores, um com 144 pb (iniciador 1), e outro com 104 pb (iniciador 2), que foram utilizados para reações de HRM com cepas de espécies dos dois subgêneros de *Leishmania*. O primeiro iniciador foi utilizado em todas as cepas de *Leishmania* testadas. O segundo iniciador foi utilizado somente para as cepas do subgênero *Viannia*. Os resultados obtidos foram bastante promissores, sendo possível com o iniciador 1, distinguir todas as espécies de *Leishmania* testadas, com exceção de *L. (L.) donovani* contra *L. (L.) infantum*, e *L. (L.) mexicana* contra *L. (L.) amazonensis*. Para o caso de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, ambas as espécies apresentaram um perfil muito similar com o iniciador 1, sendo então possível distinguir essas duas espécies com o iniciador 2. Dessa forma, a combinação dos dois iniciadores permitiu a distinção da maioria das espécies de *Leishmania* (Zampieri *et al.*, 2016).

Considerando esses resultados, o presente trabalho buscou reproduzir os protocolos de Zampieri, aplicando-os em um painel maior de amostras e submetendo o mesmo à uma validação analítica. Foram testadas 97 cepas previamente caracterizadas por isoenzimas (Cupolillo *et al.*, 1994) pertencentes à diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo as espécies de relevância clínica que circulam no Brasil.

Os resultados obtidos corroboraram os apresentados por Zampieri e colaboradores (Zampieri *et al.*, 2016), nos quais as mesmas espécies foram agrupadas nas mesmas variantes para os dois iniciadores. Contudo, como demonstrado na tabela 4.12, cinco cepas não corresponderam à espécie previamente caracterizada (uma cepa para ambos os iniciadores, uma cepa apenas para o iniciador 1, e três cepas apenas para o iniciador 2). Para entender os possíveis motivos pelos quais isso pode ter ocorrido, 56 cepas, incluindo as cinco acima citadas, foram submetidas a reações de sequenciamento de DNA para o HSP70 em plataforma Sanger. Para o iniciador 1, a cepa IOCL 3307 previamente caracterizada como *L. (L.) amazonensis* e que, portanto, deveria apresentar o perfil da variante 1A, não correspondeu à caracterização prévia, ficando agrupada no HRM na variante 1D com as cepas das espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*. Como observado na tabela 4.13, esta amostra apresentou sequência idêntica à sequência de cepas da variante 1A, inclusive à sequência da cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* (IOCL 575). No entanto, apesar da identidade das sequências de DNA, o software de análise agrupou essas cepas em variantes diferentes. Este fato pode ser devido aos valores da temperatura de dissociação obtidos para essas amostras, uma vez que a cepa IOCL 3307 apresentou um T<sub>m</sub> mais próximo aos obtidos para as cepas agrupadas na variante 1D, do que aos obtidos para as cepas agrupadas na variante 1A (Tabela 4.13). Outra possível explicação pode estar relacionada a um diferente padrão de metilação do DNA identificado pelo software nessa cepa. No entanto, para testar isso, repetições deveriam ter sido feitas, o que não foi possível. A metodologia de HRM permite rastrear eficientemente uma amostra para detectar seu nível de metilação (Colella *et al.*, 2003). Um estudo de biomarcadores de metilação do papilomavírus humano do tipo 16, em pacientes com lesões cervicais, usando HRM, foi capaz de distinguir o

DNA metilado em um nível de 1% do DNA não metilado, sendo que todos os sítios CpG esperados foram detectados com êxito (Liu *et al.*, 2018). Além disso, sabe-se que produtos amplificados de fragmentos com um alto nível de metilação, contendo uma alta proporção de citosina e guanina, apresentarão uma maior temperatura de dissociação do que fragmentos de DNA não-metilado, os quais apresentam um alto conteúdo de adenina e timina (Hussmann e Hansen, 2018).

Outro fator a ser analisado para compreender porque a cepa IOCL 3307 não foi agrupada com as *L. (L.) amazonensis*, apesar de possuir a mesma sequência de DNA de seus pares, é a curva de amplificação daquela em relação à cepa de referência (IOCL 575). Observando a figura 4.9, pode-se perceber que as curvas de amplificação das duas cepas foram distintas, sendo que a cepa IOCL 3307 apresentou um valor de Ct em torno de 19, similar à amplificação da cepa IOCL 566 (*L. (V.) braziliensis*), a qual também ficou agrupada na mesma variante (1D), enquanto que a cepa IOCL 575 (*L. (L.) amazonensis*) apresentou um valor de Ct em torno de 25. Sabendo que o valor de Ct pode interferir no perfil da curva de dissociação (Taylor *et al.*, 2010<sup>b</sup>), este fato pode justificar também a junção desta cepa na variante 1D, juntamente com a cepa IOCL 566, ao invés da variante 1A junto com a cepa IOCL 575. Com isso, analisando a sequência da cepa IOCL 3307 (Figura 4.9), pode-se perceber que as principais diferenças entre esta e as cepas que agruparam na variante 1A corretamente, estão relacionadas à presença de guanina e citosina na sequência, apresentando estas últimas uma maior temperatura de dissociação, enquanto que a cepa IOCL 3307 apresenta maior quantidade de adenina e timina, apresentando menor temperatura de dissociação. Esses dados estão de acordo com os mostrados por Hussmann e Hansen (Hussmann e Hansen, 2018).

Ainda para o iniciador 1, a cepa IOCL 3310 caracterizada previamente como *L. (V.) naiffi*, agrupou na variante 1A, diferentemente da cepa de referência de *L. (V.) naiffi* (IOCL 1365), agrupada na variante 1E. Analisando as sequências dessas mesmas amostras, observaram-se dois polimorfismos diferentes entre elas: uma substituição A>T e uma T>G na cepa IOCL 3310, enquanto que a cepa IOCL 1365 somente apresentou uma substituição T>A, na mesma posição desta última (Tabela 4.13). Isso pode explicar a

separação dessas duas cepas em variantes distintas, considerando a alta sensibilidade da técnica de HRM, sendo que um único polimorfismo na sequência já é suficiente para produzir formas diferentes da curva de dissociação (Malentacchi *et al.*, 2009).

A análise da amplificação desta cepa (Figura 4.10) mostra que a reação foi eficiente e muito próxima à da cepa de referência para *L. (V.) naiffi*, apresentando curvas similares e valores de  $C_t$  muito parecidos. Este fato confirma a separação correta pela técnica, baseada apenas nos polimorfismos observados em sua sequência. Considerando que produtos que apresentam uma amplificação tardia devido a uma quantidade limitada inicial de *template*, à degradação do *template* ou à inibição da reação de PCR, geram resultados variáveis no HRM (Taylor *et al.*, 2010), este fato não ocorreu com relação à esta cepa, pois a amplificação de ambas foi eficiente, com valores de  $C_t$  próximos a 20, e ainda assim, apresentaram perfis de dissociação distintos. Neste caso tratou-se de uma cepa (IOCL 3310) da espécie *L. (V.) naiffi*, confirmada por isoenzimas e pelo sequenciamento, apresentando inclusive uma sequência bem parecida com a da cepa de referência para *L. (V.) naiffi* (IOCL 1365). Entretanto, os poucos polimorfismos existentes foram capazes de gerar diferenças na temperatura (em cerca de 1°C) e na forma da curva de dissociação, fazendo com que o software a agrupasse em outra variante diferente da referência. Esse dado reflete a importância de testar um amplo painel de cepas, principalmente na fase de padronização de uma técnica, permitindo assim que toda a diversidade intraespecífica que existe no gênero *Leishmania* seja propriamente representada e eventualmente mais de uma cepa seja usada como referência.

Considerando a diversidade do gênero *Leishmania*, que compreende provavelmente o maior número de espécies patogênicas dentre os diferentes protozoários que parasitam humanos, existindo cerca de 20 espécies patogênicas, e considerando também que as diferentes espécies de *Leishmania* apresentam diferenças clínicas e epidemiológicas, a compreensão dessa doença e o desenvolvimento de medidas para combater a sua disseminação vão depender da capacidade de identificar as espécies e caracterizá-las geneticamente (Boité *et al.*, 2012). Atualmente, identificar

essas diferenças em nível interespecífico é um desafio, pois ainda não existe uma metodologia capaz de distinguir rapidamente, precisamente e com baixo custo essas espécies. Maior desafio ainda compreende também a identificação da diversidade intraespecífica. Ferramentas de caracterização capazes de subdividir determinado táxon ainda não são encontradas. Com isso, o desenvolvimento de tais ferramentas é fundamental, pois a diversidade de populações parasitárias do gênero *Leishmania* pode influenciar a evolução e distribuição de caracteres relacionados à virulência, resistência a drogas e infectividade (Miles *et al.*, 2009). O HRM nos permitiu distinguir dois perfis de dissociação entre cepas de uma mesma espécie, demonstrando o potencial desta abordagem para explorar a variabilidade genética em *Leishmania*.

Em relação ao iniciador 2, três cepas de *L. (V.) braziliensis* não apresentaram resultados no HRM correspondentes à caracterização prévia por isoenzimas e sequenciamento: IOCL 161, IOCL 167 e IOCL 1851. Estas cepas agruparam na variante 2A, que corresponde às espécies do complexo *L. (V.) guyanensis*, e não na variante 2B juntamente com a referência de *L. (V.) braziliensis*. Uma das explicações para esse dado é a temperatura de dissociação observada para essas três cepas. Todas apresentaram temperaturas de dissociação similares às cepas da variante 2A (em torno de 84,5°C), o que naturalmente as diferenciaria das cepas da variante 2B. Esta última variante apresentou temperaturas de dissociação ligeiramente maiores em torno de 84,8°C a 84,9°C, com variações de até 0,4°C entre as duas variantes (Tabela 4.14).

Diversos fatores influenciam o comportamento da dissociação do DNA, como a composição da mistura de reação, o tamanho da região amplificada, o conteúdo CG presente no fragmento amplificado e a concentração de DNA da amostra. Tudo isso pode interferir na forma da curva de dissociação obtida (Fisher *et al.*, 2010). A cepa IOCL 161 apresentou em sua sequência cinco polimorfismos que a diferenciam das outras cepas testadas, o que também naturalmente diferenciaria esta cepa. O mesmo fato foi observado para as outras duas cepas (IOCL 167 e IOCL 1851), com seis encontrados na sequência da cepa 167 e cinco para a 1851, em relação à cepa de referência para *L. (V.) braziliensis* (IOCL 566) [Tabela 4.14]. Isso gera uma diferença na

curva de dissociação dessas cepas, o que facilita sua separação em variantes diferentes mesmo com temperaturas de dissociação semelhantes, pois, geralmente, diferenças na curva de dissociação são mais facilmente detectáveis do que diferenças na temperatura (Stoep *et al.*, 2009; Dobrowolski *et al.*, 2009).

Esses dados apontam para a sensibilidade da técnica de HRM, permitindo a separação de cepas que apresentam diferenças mínimas na temperatura de dissociação. Isso está de acordo com relatos prévios da literatura, inclusive há relatos de que o HRM é capaz de diferenciar sequências com polimorfismos que produzem uma diferença menor que 0,2°C na temperatura de dissociação (Tesoriero, 2008; Fisher *et al.*, 2010).

Estas cepas apresentam um histórico epidemiológico que pode justificar as diferenças detectadas nas sequências nucleotídicas. As cepas IOCL 161 e IOCL 167 foram isoladas de cães no estado do Espírito Santo, Brasil, e caracterizadas como *L. (V.) braziliensis*, espécie mais frequentemente associada à casos da forma cutânea da doença e principal agente causador da forma mucocutânea da leishmaniose (Lainson e Shaw, 1978). Essa forma clínica é mais comum em humanos, sendo a forma clássica canina da doença a leishmaniose visceral, causada, nas Américas, por *L. (L.) infantum*. Os cães são considerados os principais hospedeiros reservatórios de *L. (L.) infantum*, que é o parasita de maior preocupação zoonótica, particularmente no Brasil, onde aproximadamente 3.500 casos de leishmaniose visceral humana são reportados anualmente (Dantas-Torres, 2009). Entretanto, em certas áreas, os ciclos de transmissão enzoótica de diferentes espécies do gênero *Leishmania* podem se sobrepor, podendo assim ocorrer co-infecção nos cães. Com isso, alguns casos de co-infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* já foram relatados no sudeste do Brasil (Madeira *et al.*, 2006).

Já a cepa IOCL 1851 foi isolada de um flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* no estado do Ceará, Brasil. A transmissão das leishmanioses na América do Sul ocorre pelos vetores do gênero *Lutzomyia*, sendo que cada espécie de *Leishmania* normalmente é transmitida por mais de uma espécie do flebotomíneo vetor e a preferência por hospedeiros

mamíferos também vai variar de acordo com a espécie de *Leishmania* (Grimaldi *et al.*, 1993).

Essas duas situações representam a diversidade que pode ser encontrada dentro do gênero *Leishmania*. Podemos observar assim três casos que exemplificam essa diversidade, pois as cepas são de regiões distintas e hospedeiros diferentes. É esperado encontrar cepas que apresentem um perfil diferente, principalmente para a espécie *L. (V.) braziliensis* proveniente dessas circunstâncias. Considerando que uma vez em cultura, células específicas ou alelos específicos podem estar sendo selecionados conforme uma determinada cepa é mantida em cultura, ao longo das várias passagens necessárias à manutenção da mesma (Bañuls *et al.*, 1999), percebemos a importância de se cobrir a diversidade encontrada neste táxon, principalmente durante ensaios de padronização.

Diante desses fatos, é reforçada a importância de se ter uma metodologia capaz de identificar diferenças genéticas inter e intraespecíficas em *Leishmania*, principalmente para o subgênero *Viannia*. As espécies do subgênero *Viannia*, que é restrita às Américas (Kerr, 2000), variam enormemente quanto à diversidade, sendo que *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi* apresentam um alto grau de polimorfismos isoenzimáticos, ou seja, uma alta variedade intraespecífica, com a presença de diversos zimodemas, enquanto que cepas de *L. (V.) guyanensis* são mais homogêneas (Cupolillo *et al.*, 1994; Cupolillo, 2004). Esses dados reforçam os resultados obtidos neste estudo, onde a maioria das cepas que não corresponderam à respectiva cepa de referência pelo HRM, pertenciam às espécies mais variáveis do subgênero *Viannia*. Outro fator positivo da técnica de HRM é o percentual de 100% obtido com os ensaios de reprodutibilidade. Foram realizados dois experimentos iguais, com as mesmas amostras, nas mesmas condições e em dias diferentes. Em ambos os experimentos, o resultado foi exatamente o mesmo para todas as cepas selecionadas para esta etapa.

Após a verificação da reprodutibilidade do ensaio, foi realizada a validação desta metodologia com amostras clínicas de pacientes, submetidos à determinação de carga parasitária por qPCR, e diagnosticados com leishmaniose cutânea. De um total de 66 amostras validadas, 24% foram divergentes da sua caracterização prévia, 22% apresentaram resultados

inconclusivos e 15% foram negativas (Tabela 4.16). Das 16 amostras que não corresponderam à caracterização prévia, 81% apresentaram um valor de  $C_t$  muito próximo ou acima de 30, e uma baixa carga parasitária. A exceção foram três amostras (400, 424 e 458) que apresentaram ou uma alta carga parasitária e/ou valores de  $C_t$  menores que 30, e um resultado discordante da caracterização prévia. Essas três amostras podem representar o percentual de erro esperado em amostras com carga parasitária alta, uma vez que correspondem a 18% do total de amostras que não corresponderam à caracterização prévia. As amostras com valor de  $C_t$  maiores que 36 foram consideradas negativas.

Ao comparar a carga parasitária determinada por qPCR com os resultados de HRM foi possível observar que um percentual maior de erro ocorreu naquelas amostras que apresentaram menor carga parasitária por qPCR, com exceção de uma amostra. Sendo assim, a especificidade do HRM varia de acordo com a carga e o valor de  $C_t$  da amostra. Essa hipótese não foi rejeitada por White e Potts em 2006, nem por Taylor e colaboradores em 2010, em que sugere-se que para a obtenção de um resultado eficiente no HRM, amostras cujo valor de  $C_t$  foi maior que 30 ciclos não devam ser consideradas, pois produtos que apresentam uma amplificação tardia geram resultados menos fidedignos no HRM (White e Potts, 2006; Taylor *et al.*, 2010<sup>b</sup>). Diante disso, é bem provável que a carga parasitária tenha um efeito na especificidade do HRM.

Para 38% das amostras os resultados convergiram com a caracterização prévia. Considerando esses dados e comparando-os com dados descritos na literatura, é possível perceber que o HRM, para a aplicação em amostras clínicas com obtenção de resultados confiáveis com relação à identificação de espécies infectantes, estudos adicionais devam ser realizados buscando identificar e aprimorar os fatores que possam estar interferindo na correta diferenciação dessas amostras. Como exemplos, podemos citar a otimização da reação para a obtenção de melhores valores de  $C_t$ , favorecendo as condições de amplificação, e também a análise baseada na carga parasitária, a fim de determinar o ponto de corte a partir do qual a especificidade do HRM se reduz. Esses fatores devem ser considerados para a utilização da técnica de HRM para o diagnóstico

molecular e caracterização da espécie de *Leishmania* a partir de amostras clínicas. Nos resultados de Ceccarelli e colaboradores foi observado que perfis de dissociação reprodutíveis eram obtidos quando os valores de  $C_t$  dos amplicons eram aproximadamente de 20 a 30. Fora dessa faixa, era difícil conseguir fazer uma comparação entre os perfis de dissociação, e isso então poderia ser uma limitação do método quando amostras clínicas com baixa carga parasitária são analisadas (Ceccarelli *et al.*, 2014).

Estudos prévios na literatura (Zampieri *et al.*, 2016; Ziwei *et al.*, 2017) concluem que o HRM é um método de baixo custo, fácil aplicação, rápido e eficiente, é um procedimento potencialmente automatizado, sendo uma boa alternativa para a detecção, quantificação e identificação de espécies de *Leishmania* em amostras biológicas e clínicas. Nossos dados corroboram essa informação e apontam que o HRM é um método bastante promissor para a diferenciação de espécies de *Leishmania* e candidato a substituir o ensaio de isoenzimas. No entanto, deve-se ter parcimônia ao utilizá-lo para a caracterização diretamente de material clínico, sem o isolamento prévio do parasita em cultura, pois nessas condições, ainda é necessário um aprimoramento da metodologia.

Outros iniciadores foram desenhados para alvos em que já se conhecia a capacidade discriminatória daquela região do genoma, como por exemplo o Citocromo Oxidase I (COI). Os resultados foram positivos, porém ainda podem ser melhor explorados. Ainda assim, possibilitaram complementar a separação de espécies não abordadas anteriormente, sendo possível separar *L. (L.) donovani* de *L. (L.) infantum* e *L. (V.) panamensis* de *L. (V.) guyanensis/L. (V.) shawi*. Com isso, os resultados obtidos para este alvo são bem promissores, sendo possível diferenciar espécies filogeneticamente próximas, quase indistinguíveis por outras metodologias (Jamjoom *et al.*, 2004).

Dois dos quatro pares de iniciadores desenhados para este alvo não cumpriram seu objetivo inicial. São eles o COI 129, cujo objetivo foi diferenciar *L. naiffi* das outras espécies, e COI 428, desenhado para diferenciar *L. guyanensis* de *L. panamensis/L.shawi*. Isso pode ter ocorrido devido à classe de SNPs na qual o polimorfismo flanqueado pelos iniciadores se encontra. Os SNPs são categorizados em quatro classes (I, II, III e IV). A

classe IV de SNPs é a mais rara e a mais difícil de identificar, pois consiste em variações A>T e T>A, ou seja, difere das outras classes por uma única ponte de hidrogênio entre as bases nitrogenadas que compõem o nucleotídeo, resultando na menor variação de temperatura da curva de dissociação. Isso se dá porque a energia necessária para quebrar uma dupla ponte de hidrogênio, que é a ligação presente nos polimorfismos de classe IV, será menor quando comparada à energia necessária para quebrar uma tripla ponte de hidrogênio, que é a ligação presente nos polimorfismos das classes de I a III (Taylor *et al.*, 2010<sup>b</sup>). Com isso, o alinhamento utilizado foi verificado na região do iniciador COI 428, para a análise dos polimorfismos encontrados no fragmento amplificado. Foi verificada a presença de duas substituições de base única: T>C e G>A. Isso explica o fato do objetivo para o qual o iniciador foi desenhado não ter sido atingido. Ambos os polimorfismos encontrados são de classe I, ou seja, vão formar a mesma quantidade de ligações de hidrogênio. Dessa forma, a energia necessária para separar esses fragmentos será a mesma, uma vez que um polimorfismo compensará o outro, não gerando diferenças nos padrões de dissociação para as espécies analisadas. Para a confirmação dessa hipótese, a temperatura de dissociação do fragmento amplificado foi calculada, de acordo com a regra de Wallace (Wallace *et al.*, 1979), para as três espécies envolvidas no objetivo do uso deste iniciador, sendo encontrados os mesmos valores de T<sub>m</sub> para as três espécies (T<sub>m</sub>=80°C), não rejeitando a hipótese anterior.

Assim, diante desses dados, através da combinação dos iniciadores descritos por Zampieri com os iniciadores desenhados neste estudo para o alvo COI, foi desenvolvido um algoritmo separando as principais espécies de relevância clínica em *Leishmania*. Esse algoritmo está representado na figura 4.18 e potencialmente pode ser usado em rotina de tipagem de *Leishmania* utilizando DNA de formas promastigotas do parasito, isoladas e cultivadas.

## 6. Conclusões

O alvo HSP70 mostrou boa especificidade e sensibilidade além de alta concordância com os resultados da quantificação por 18S rDNA, sendo mais específico que o 18S rDNA para a detecção de *Leishmania*. Esses resultados associados à validação analítica provaram que a qPCR utilizando o alvo HSP70 é a melhor opção diagnóstica para quantificação parasitária em casos de leishmaniose tegumentar.

O algoritmo baseado em HRM permitiu a diferenciação das principais espécies que causam leishmaniose tegumentar e visceral, permitindo também a detecção da diversidade intra e interespecífica que existe em *Leishmania*, podendo então ser utilizado na rotina para a identificação de espécies em amostras de cultura. Além disso, demonstrou um potencial para a identificação de espécies diretamente a partir de amostras de pacientes, desde que seja estabelecido um valor de corte, baseado no valor de  $C_t$ .

## 7. Referências Bibliográficas

Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology* 2014; 141: 1891–1897.

Aghaei Afshar A, Rassi Y, Sharifi I, Vatandoost H, Mollaie HR, Oshaghi MA, et al. First report on natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus sergenti* due *Leishmania tropica* by high resolution melting curve method in Southeastern Iran. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 93-96.

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(3): e0004349.

Alborzi A, Rasouli M, Shamsizadeh A. *Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 306–307.

Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* 1983; 32: 307–317.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7: e35671.

Amar C, Dear PH, McLauchlin J. Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. *J Med Microbiol* 2003; 52: 681-683.

Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GAS. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 992-997.

Ashtiani ZO, Mehrsai AR, Pourmand MR, Pourmand G. High Resolution Melting Analysis for rapid detection of PIK3CA gene mutations in bladder cancer: A mutated target for cancer therapy. *Urol Oncol* 2017; 15(01): 6000-6005.

Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 2007; 25: 203-211.

Bañuls A, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol* 1999; 29: 1137-1147.

Bañuls A, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007; 64: 1-109.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 2009; 42: 317-322.

Bastien P, Blaineau C, Pages M. *Leishmania*: sex, lies and karyotypes. *Parasitol Today* 1992; 8: 174-181.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6): 1897-190.

Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002; 18: 337–342.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1435–1439.

Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002; 48: 1178–1185.

Berg RJ, Vaessen N, Endtz HP, Schulin T, Vorm ER, Kuijper EJ. Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicenter study. *J Med Microbiol* 2007; 56: 36 – 42.

Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ES, Luciano MC, Bevilaqua CM. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Exp Parasitol* 2011; 129: 234–239.

Blaineau C, Bastien P, Pages M. Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50: 197-204.

Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999; 8: 135-60.

Bock JH, Langer PJ. Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62(2): 187-197.

Boite MC, Mauricio IL, Miles MA, Cupolillo E. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania (Viannia)* parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1888.

Bossolasco, S., G. Gaiera, D. Olchini, M. Gulletta, L. Martello, A. Bestetti et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol* 2003; 41: 5080–5084.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da mortalidade. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2011. (Série A: Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2017.

Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* 1998; 92(3): 351–366.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169–93.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 365–79.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 192–223.

Campioni, F. Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens de *Salmonella Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos e frangos no Brasil. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Ciências Farmacêuticas] – Universidade de São Paulo; 2013.

Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR Methods for Quantitative Gene Expression in Tung Tree Tissues. *J Agric Food Chem* 2012; 60(50): 12296-12303.

Carvalho EM, Correa-Filho D, Barcelar O, Almeida RP, Less H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 273-277.

Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2): 540-546.

Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 122–132.

Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. *PLoS One* 2014; 9(2): e88845.

Centers for Disease Control and Prevention [<https://www.cdc.gov/>]. *Leishmania* biological cycle. [acesso em 30 mar 2018]. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Chance ML. The identification of *Leishmania*. *Symp Br Soc Parasitol* 1979; 17: 55-74.

Chaniotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM. Horizontal and vertical movement of phlebotominae sandflies in Panamanian rain forest. *J Med Entomol* 1974; 11: 369-375.

Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *Brit Med J* 2006; 333: 723–726.

Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003; 35: 146–50.

Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodriguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002; 359: 1124– 1125.

Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 129: 53–59.

Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 2000; 16: 142–144.

Cupolillo E, Boité MC, Porrozzi R. Considerações sobre a taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: Conceição-Silva F, Alves CR. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 39-47.

Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 617-626.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 663-668.

Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(3): 296-311.

Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89: 17-21.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors* 2009; 2 (Suppl 1): S1

Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van Der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dis* 2008; 198: 1565–1572.

Desjeux P. Leishmaniasis current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305-318.

Dobrowolski SF, Gray J, Miller T, Sears M. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high resolution melt profiling. *Hum Mutat* 2009; 30: 891–898.

Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sandflies: parasite-vector interactions overview. *Parasite Vector* 2012; 5: 276–288.

Dujardin JC, Victoir K, De Doncker S, Guerbouj S, Arévalo J, Le Ray D. Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (Suppl 1): S 81–86.

Edwards T, Sasaki S, Williams C, Hobbs G, Feasey NA, Evans K *et al.* Speciation of common Gram-negative pathogens using a highly multiplexed high resolution melt curve assay. *Scientific Reports* 2018; 8: 1114.

Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol* 2016; 15: 1-13.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 66(2): 261-271.

Fisher C, Meng R, Bizouarn F, Scott R. High Resolution Melt Parameter Considerations for Optimal Data Resolution. *Bio-Rad Bulletin: Gene Expression Division, Bio-Rad Laboratories Inc.* 2010; Tech note 6009.

Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology* 2007; 134: 369–377.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 238–45.

Francino O, Altet L, Sánchez Robert E, Rodriguez A, Solano Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2006; 137(3-4): 214-221.

Furtado T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J. Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1994. p.319-328.

Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Malariol y Sal Amb* 1995; 35: 133–142.

Galati EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R (Eds) Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 23–52.

Galati EAB, Andrade-Filho JD, Silva ACL, Falcão AL. Description of a new genus and new species of New World Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Rev. Bras. Entomol* 2003; 47(1): 63–70.

Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2018; 11: 273.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical

*Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol 2004; 42: 2294-2297.

Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo A, et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. Infect Genet Evol 2005; 5: 109–116.

Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007; 101: 368–371.

Gardner PJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: a review of nomenclature and classification. Trop Dis Bulletin 1977; 74: 1069-1088.

Garnham PCC. Introduction. In: Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Cambridge University Press 1987; 1: 13-25.

Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. Biochem Med (Zagreb) 2015; 25(2): 141–51.

Godfrey DC. The zymodemes of trypanosomes. In: Problems in the identification of parasites and their vectors. Symp Brit Soc Parasitol 1979; 17: 31-53.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36(1): 71-80

Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am 2012; 26: 293–307.

Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, et al. Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based realtime PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in

an area where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. J Clin Microbiol 2017; 55: 526–534.

Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Neto MPO, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012; 107(5): 664-674.

Graham R, Liew M, Meadows C, Lyon E, Wittwer CT. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. Clin Chem 2005; 51: 1295–1298.

Grevelink SA, Lerner E. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol 1996; 34: 257-272.

Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am 2012; 26: 309-322.

Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am J Trop Med Hyg 1989; 41: 687–725.

Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol 1993; 6: 230–250.

Guillaume JJM, Schoone GJ, Kroon NCM, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol Biochem Parasitol 1992; 51: 133-142.

Guizani I, Van Eys GJJM, Ismail RB, Dellagi K. Use of recombinant DNA probes for species identification of Old World *Leishmania* isolates. Am J Trop Med Hyg 1994; 50: 632-640.

Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1393–1404.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7): 1989-1995.

Hitakarun A, Tan-ariya P, Siripattanapipong S, Mungthin M, Piyaraj P, Naaglor T, et al. Comparison of PCR methods for detection of *Leishmania siamensis* infection. *Parasit Vectors* 2014; 7: 458.

Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors* 2014; 7: 501.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-1199.

Hussmann D, Hansen LL. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM). In: Tost J. *DNA Methylation Protocols. Methods Mol Biol* (1708). Nova lorque: Humana Press; 2018: 551-571.

Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Chance ML, Kemp SJ, Watts PC, et al. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and “ *L. archibaldi* ” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology* 2004; 129: 399–409.

Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1826–1833.

Jiménez M, Alvar J, Tibayrenc M. *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too; epidemiological implications. *AIDS* 1997; 11: 569-573.

Jirkú M, Yurchenko VY, Lukes J, Maslov DA. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. *J Eukaryot Microbiol* 2012; 59: 537–547.

Kamau E, Tolbert LS, Kortepeter L, Pratt M, Nyakoe N, Muringo L, Ogutu B, Waitumbi JN, Ockenhouse CF. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of *Plasmodium* by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2946 –2953.

Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, et al. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 2004; 119: 329–341.

Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21: 123-152.

Kathleen V, Bañuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noël S, et al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology* 1998; 117: 1-13.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72(1): 87-93.

Kiehl MF. Identificação de variações de sequência no gene *CFTR* em pacientes com Fibrose Cística. Porto Alegre. Dissertação. [Mestrado em Genética e Biologia Molecular] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Path Exot* 1985; 78: 747-755.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol J* 1990; 4: 1–24.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Tang Y, Bastien P. Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 1996; 3: 55–60.

Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, Alabaz D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of Old World Leishmaniasis. *Exp Parasitol* 2016; 164: 10.1016/j.exppara.2016.02.007.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95– 125.

Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature* 1978; 273: 595-600.

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of the South American Leishmaniasis. In: Lumsden HR, Evans DA (eds). *Biology of the Kinetoplastida*. 2. ed. Londres: Academic Press; 1979. p. 1-116.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. Londres: Academic Press; 1987. p. 12-120.

Lane RP. Sandflies (Phlebotominae). In: Lane RP, Crosskey RW (Eds.). *Medical Insects and Arachnids*. Londres: Chapman e Hall; 1993. p. 78-119.

León CM, Muñoz M, Hernández C, Ayala MS, Flórez C, Teherán A, et al. Analytical Performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real

Time PCR (qPCR) Assays for the Detection of Six *Leishmania* Species DNA in Colombia. *Front Microbiol* 2017; 8: 1907.

Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4121–4125.

Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 1988; 22: 631–637.

Liu L, Ying C, Zhao Z, Sui L, Zhang X, Qian C, *et al.* Identification of reliable biomarkers of human papillomavirus 16 methylation in cervical lesions based on integration status using high-resolution melting analysis. *Clin Epigenetics* 2018; 10: 10.

Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, *et al.* Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* 2004; 128: 483–491.

Lopes EG, Geraldo CA, Marcili A, Silva RD, Keid LB, Oliveira TMFS, *et al.* Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2016; 58: 41.

MacFarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Kelly JM. Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 1990; 190: 377–384.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292–305.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190–212.

Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SDJ. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationship between species and strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitology* 1992; 53: 63-70.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MC: Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 442-445.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo CX, Confort EM, Marzochi MC: Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitology* 2006; 138: 366-370.

Malentacchi F, Forni G, Vinci S, Orlando C. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential high resolution melt analysis protocol. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e86.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (Espundia Escamel,1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 859-876.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5249–5255.

Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 858 – 863.

Marzochi MCA. As Leishmanioses no Brasil. As Leishmanioses Tegumentares. *J Bras Med* 1992; 63(5-6): 82-104.

Marzochi MC, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and for their control. *Cad Saude Pública* 1994; 10: 359-375.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000; 16: 188-189.

Maurya R, Mehrotra S, Prajapati VK, Nylén S, Sacks D, Sundar S. Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing *Leishmania* parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1932–1934.

Meide WF, Peekel I, van Thiel PP, Schallig HD, de Vries HJ, Zeegelaar JE, Faber WR. Treatment assessment by monitoring parasite load in skin biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis, using quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Clin Exp Dermatol* 2008; 33: 394 – 399.

Mendoza-Leon A, Havercroft JC, Barker DC. The RFLP analysis of the b-tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitology* 1995; 111: 1-9.

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 2009; 136: 1.509-1.528.

Molina I, Fisa R, Riera C, Falcó V, Elizalde A, Salvador F, et al. Ultrasensitive real-time PCR for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89: 105–10.

Momen H. Parasite characterization by zimodeme analysis. In: Morel CM. (ed.) *Genes and Antigens of Parasites: A laboratory manual*. Rio de Janeiro: UNDP/WHO-FINEPCNPq-FIOCRUZ; 1984. p. 111-120.

Montenegro J. A cutis-reação na leishmaniose. In: Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo. São Paulo: 1926. p. 323-330.

Moreau F, Fetouchi R, Micalessi I, Brejeon V, Bacon N, Jannes G, *et al.* Detection and genotyping of human papillomavirus by real-time PCR assay. *J Clin Virol* 2012; 56(3): 10.1016/j.jcv.2012.11.003.

Moreira OC, Yadon ZE, Cupolillo E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: current status and perspectives. *Acta Trop* 2017; 29(17): 30485-0.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; 24: 954–958.

Murray HW, Berman JD, Davis CR, Saravia NG. Advances in Leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366: 1561–77.

Munoz EB, Santander S, Rojas-Silva P, Cardenas PA, Fornasini M, Cifuentes SC, *et al.* Diagnostic efficacy of molecular techniques for detection and identification of *Leishmania* species in human whole blood and skin samples from Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2016; 95: 803–805.

Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015; 439: 231-250.

Nicolas L, Milon G, Prina E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J Microbiol Methods* 2002; 51: 295-299.

Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol* 1999; 29: 331–339.

Organizacion Mundial de la Salud – Lucha contra las leishmaniasis. Ginebra, OMS, 178p. (Série de Informes Técnicos, 793) 1990.

Organização Mundial de Saúde. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: OMS, 2010. (WHO technical report series; no. 949).

Organização Mundial de Saúde. Weekly epidemiological record. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. Geneva, 22 September 2017. Geneva: OMS, 2017. (Weekly epidemiological record; no 38, 92: 557–572).

Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi JrG, Momen H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: Rioux JA. *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-épidémiologiques. Montpellier: IMEEE; 1986. p. 57-65.

Pacheco RS, Fernandes O, Salinas G, Segura I, Momen H, Degraeve W, et al. Intraspecific heterogeneity in the mini-exon gene localization of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Colombia. J Parasitol 2000; 86: 1250-3

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis 1996; 22: 1-13.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, et al. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. Parasit Vectors 2012; 5: 15.

Pereira EFA, Thomaz-Soccol V, Lima H, Thomaz-Soccol A, Castro E, Mulinari-Brenner F, et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Paraná state of southern Brazil. Exp Dermatol 2008; 17: 1024-1030.

Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuypere S, Hide M, Bañuls AL, Doncker S, et al. Fluorogenic Assay for Molecular Typing of the *Leishmania donovani* Complex: Taxonomic and Clinical Applications. *J Infect Dis* 2005; 192: 685–92.

Ramírez CA, Requena JM, Puerta CJ. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasit Vectors* 2011; 26(4): 166.

Ramírez JC, Cura IC, Moreira OC, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Jamírez JD, Alberti A, Paiva P, Flores-Chávez MD, et al. Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. *J Mol Diagn* 2015; 17: 605-615.

Ready PD, Pesson B. Hybridization, introgression and distribution of vectorial traits. [Apresentação no III International Symposium on Phlebotomine Sandflies; 1999; Montpellier, France].

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 2014; 6: 147–54.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 597–608.

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 21–25.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 359-371.

Richardson BJ, Baverstock PR, Adams M. Allozyme Electrophoresis. Academic Press Sydney 1986; 403.

Riou G, Delain E. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of caterated forms. Proc Nat Acad Sci Wash 1969; 62: 210-217.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pralong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of Leishmania using isoenzymes suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp 1990; 65: 111-125.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. Anal Biochem 1997; 245(2): 154-160.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol 1990; 71(3): 267-275.

Romero I, Téllez J, Suárez Y, Cardona M, Figueroa R, Zelazny A, Saravia NG. Viability and burden of Leishmania in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4: e819.

Romero GA, Noronha EF, Pirmez C, Pires FE, Fernandes O, Nehme NS, Cupolillo E, Firoozmand L, da Graça GC, Volpini A, Santos SL, Romanha AJ. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for Leishmania detection using skin biopsy imprints on filter paper. Acta Trop 2009; 109: 74-77.

Roque, ALR, Cupolillo, E, Marchevsky, RS and Jansen, AM. Thrichomys laurentius (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4: e589.

Ross R. Further Notes on Leishmania's bodies. Brit Med J 1903; 11:1401.

Saf'janova V. Classification of the genus *Leishmania* ross. In: The Leishmaniasis Lennigrad: Academy of Sciences, USSR. All Union Society of Protozoologists; 1982.

Saravia NGL, Valderrama M, Labrada AF, Holguín C, Navas G, Palma A, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J Infect Dis* 1989; 159: 725-735.

Seccombe AK, Ready PD, Huddleston LM. A catalogue of Old World Phlebotomine sandflies (Dip- tera: Psychodidae). *Occas Pap Syst Entomol* 1993; 8: 1–57.

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 349-358.

Schonian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol* 2010; 26: 466–469.

Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, et al. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1529–35.

Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 66: 709-717.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and Mem Inst Oswaldo Cruz future trends and their implications. 1994; 89: 471–478.

Shaw JJ. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. *Braz J Genet* 1997; 20: 1.

Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 2002; 9: 43–50.

Simpson L, Neckelman N, Cruz VF, Simpson AM, Feagin JE, Jasmer DP *et al.* Comparison of the Maxicircle (Mitochondrial) Genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the Level of Nucleotide Sequence. *J Biol Chem* 1987; 262 (13): 6182-6196.

Solcà M da S, Bastos LA, Guedes CES, Bordoni M, Borja LS, Larangeira DF, *et al.* Evaluating the Accuracy of Molecular Diagnostic Testing for Canine Visceral Leishmaniasis Using Latent Class Analysis. *PLoS ONE* 2014; 9(7): e103635.

Souto RP, VARGAS N, ZINGALES B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol* 1999; 91: 306–314.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 2004; 189: 1729–1733.

Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 1999; 118(Pt. 1): 107–116.

Stoep N, van Paridon CDM, Janssens T, Krenkova P, Stambergova A, Macek M, Matthijs G, Bakker E. Diagnostic guidelines for high resolution melting curve analysis: an interlaboratory validation of *BRCA1* mutation scanning using the 96- well LightScanner (IT). *Hum Mutat* 2009; 30: 899–909.

Sudarshan M, Weirather JL, Wilson ME, Sundar S. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1751–1755.

Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Parana, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 47–52.

Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, *et al.* Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. Louzir H, ed. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(1): e581. doi:10.1371/journal.pntd.0000581.

Tanriverdi S, Tanyeli A, Baslamisli F, Koksall F, Kilinc Y, Feng X, *et al.* Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3237-3244.

<sup>a</sup>Taylor VM, Muñoz DL, Cedeño DL, Vélez ID, Jones MA, Robledo SM. *Leishmania tarentolae*: utility as an *in vitro* model for screening of antileishmanial agents. *Exp Parasitol* 2010; 126(4): 471-475.

<sup>b</sup>Taylor S, Scott R, Kurtz R, Fisher C, Patel V, Bizouam F. A practical guide to high resolution melt analysis genotyping. Bio-Rad Laboratories 2010; Bulletin 6004.

Tesoriero A. HRM applications. Lecture presented at: Advances in qPCR; September 17-18, 2008; Stockholm, Sweden. <http://www.gene-quantification.org/tesori-talk-hrm-adv-qPCR-2008.pdf>, accessed November 4, 2010. In: Fisher *et al.* 2010.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*,

*Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Nat Acad Sci USA 1990; 87: 2414-2418.

Tibayrenc, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv Parasitol 1995; 36: 47–115.

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int J Parasitol 1998; 28: 85-104.

Tibayrenc M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. Parasitol Today 1998; 14: 323-329.

Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol 2002; 18: 405-410.

Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. Parasite Immunol 1985; 7: 545–555.

Tomaz-Pérez M, Fisa R, Riera C. The Use of Fluorescent Fragment Length Analysis (PCR-FFL) in the Direct Diagnosis and Identification of Cutaneous *Leishmania* Species. Am J Trop Med Hyg 2013; 88(3): 586–591.

Verna S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. PLoS One 2010; 5: e10107.

Vickerman K, Preston TM. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA. Biology of the Kinetoplastida. London/New York/San Francisco: Academic Press; 1976. p. 35-130.

Victoir K, Banuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, *et al.* The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus Viannia. *Parasitology* 1998; 117: 1-13.

Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. Increased transmission potential of *Leishmania major*/*Leishmania infantum* hybrids. *Int J Parasitol* 2007; 37: 589–593.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90: 31-37.

Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. *Nucleic Acids. Res* 1979; 6: 3543.

Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 260–271.

White H, Potts G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science), HR1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology). Technology Assessment. National Genetics Reference Laboratory (Wessex), Salisbury, UK; 2006.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22(1): 130-138.

Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Lima ACS, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High Resolution Melting Analysis targeting HSP70 as a fast and efficient method for the discrimination of *Leishmania* species. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(2): 4485.

Zhang WW, Miranda-Verastegui C, Arevalo J, Ndao M, Ward B, Llanos-Cuentas A, Matlashewski G. Development of a genetic assay to distinguish between *Leishmania Viannia* species on the basis of isoenzyme differences. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 801– 809.

Zurita AI, Rodriguez J, Pinero JE, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, *et al.* Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513–663). *J Parasitol* 2003;89:372–378.

## 8. Anexos

**Anexo 1.** Pannel de cepas de *Leishmania* e de outros protozoários da família Trypanosomatidae utilizados neste estudo, com a indicação dos respectivos experimentos nos quais foram incluídos.

Amostras	Espécie	Código Internacional	País	Estado	Origem	Referência	Experimento
IOCL 161	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MCAN/BR/1982/CV-2	Brasil	ES	CLIOC	NÃO	Validação HRM
IOCL 166	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MCAN/BR/1982/CV-23	Brasil	ES	CLIOC	NÃO	Validação HRM
IOCL 167	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MCAN/BR/1982/CV-20	Brasil	ES	CLIOC	NÃO	Validação HRM
IOCL 240	<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	MHOM/HN/1979/INC-4	Honduras	EP	CLIOC	SIM	Padronização qPCR e HRM (COI)/ Especificidade e sensibilidade qPCR
IOCL 262	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/1983/DAY	Brasil	MA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
IOCL 322	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/1983/JGL	Brasil	MA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
IOCL 390	<i>Leishmania (Viannia) sp.</i>	MHOM/VE/1980/PM-H23	Venezuela	Portuguesa	CLIOC	NÃO	Validação HRM

<b>IOCL 561</b>	<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL21	Belize	-	CLIOC	SIM	Padronização HRM
<b>IOCL 563</b>	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	MHOM/ET/1967/HU3	Etiópia	Begemender	CLIOC	SIM	Padronização HRM
<b>IOCL 565</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147	Brasil	PA	CLIOC	SIM	Padronização HRM e qPCR/Reprodutibilidade HRM/Especificidade e sensibilidade qPCR
<b>IOCL 566</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903	Brasil	PA	CLIOC	SIM	Padronização HRM e qPCR/Reprodutibilidade HRM/Linearidade, especificidade e sensibilidade qPCR
<b>IOCL 571</b>	<i>Leishmania (Leishmania) tropica</i>	MHOM/AZ/1958/STRAINOD	Azerbaijão	Kirovobad	CLIOC	SIM	Padronização HRM

<b>IOCL 575</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH8	Brasil	PA	CLIOC	SIM	Padronização HRM/ Reprodutibilidade HRM/ Especificidade e sensibilidade qPCR
<b>IOCL 577</b>	<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	MNYC/BZ/1962/M379	Belize	Cayo	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 579</b>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/1974/PP75	Brasil	BA	CLIOC	SIM	Padronização HRM/Reprodutibilidade HRM
<b>IOCL 581</b>	<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	MHOM/TM/1973/5-ASKH	Turquemenistão	Asgabate	CLIOC	SIM	Padronização HRM
<b>IOCL 582</b>	<i>Leishmania hertigi</i>	MCOE/PA/1965/C8	Panamá	-	CLIOC	SIM	Padronização HRM
<b>IOCL 615</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/1985/MNB	Brasil	BA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 849</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1987/J.CARLOS	Brasil	RJ	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 888</b>	<i>Leishmania equatorensis</i>	MCHO/EC/1982/LSP1	Equador	Guayas	CLIOC	SIM	Padronização HRM

<b>IOCL 897</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MDID/BR/1987/IM3217	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 1023</b>	<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426	Brasil	PA	CLIOC	SIM	Padronização HRM/Reprodutibilidade HRM
<b>IOCL 1043</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/PY/1987/FB	Paraguai	-	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 1048</b>	<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	MHOM/NI/1988/ZE09	Nicarágua	Chontales	CLIOC	SIM	Padronização qPCR e HRM (COI)/Especificidade e sensibilidade qPCR
<b>IOCL 1071</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	IFLA/BR/1985/IM2511	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 1109</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/1988/IM3494	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 1245</b>	<i>Leishmania colombiensis</i>	IGOM/PA/1985/E582.34	Panamá	Colón	CLIOC	SIM	Padronização HRM
<b>IOCL 1365</b>	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	MDAS/BR/1979/M5533	Brasil	PA	CLIOC	SIM	Padronização HRM/Reprodutibilidade HRM

<b>IOCL 1545</b>	<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	MCEB/BR/1984/M8408	Brasil	PA	CLIOC	SIM	Padronização HRM/Reprodutibilidade HRM
<b>IOCL 1731</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MCUN/BR/1992/IM154	Brasil	RO	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 1734</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1991/IM3713	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 1851</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	ILON/BR/1991/LU1115	Brasil	CE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 1917</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1994/IM3749	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2130</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MCAN/BR/1992/CS-3	Brasil	ES	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2134</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1994/HCA-1	Brasil	ES	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2139</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1996/GBS	Brasil	PB	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2160</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1996/SBS	Brasil	BA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2188</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1997/CFN	Brasil	RJ	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2287</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1998/AFS	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2288</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1996/MAS	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2291</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1997/ASB	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM

<b>IOCL 2292</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1997/EJSS	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2335</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 203P	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2337</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 210P	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2344</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 229P	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2356</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 246P	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2371</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 292P	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM/ Padronização e Especificidade e sensibilidade qPCR
<b>IOCL 2405</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 325P	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2429</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/XXXX/LB3456	Brasil	BA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2430</b>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/1999/SAUIPE	Brasil	BA	CLIOC	NÃO	Validação HRM

<b>IOCL 2490</b>	<i>Leishmania (Viannia) sp.</i>	MHOM/BR/2002/NMT-RBO004	Brasil	AC	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2495</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-RBO025	Brasil	AC	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2497</b>	<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	MHOM/BR/2002/NMT-RBO027P	Brasil	AC	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2501</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-RBO037	Brasil	AC	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2502</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-RBO040	Brasil	AC	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2538</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/EMM	Brasil	RJ	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2571</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2003/NJS	Brasil	MS	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2586</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2003/ERSS	Brasil	MS	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2647</b>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/2003/ACS	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2660</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2004/ARARAQUARA-1	Brasil	SP	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2679</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2002/RSRR	Brasil	MS	CLIOC	NÃO	Validação HRM

<b>IOCL 2689</b>	<i>Leishmania (Viannia) utingensis</i>	ITUB/BR/1977/M4964	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação e Reprodutibilidade HRM
<b>IOCL 2690</b>	<i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i>	MHOM/BR/1966/M15733	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação e Reprodutibilidade HRM
<b>IOCL 2693</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MNEC/BR/2003/NECTOMYS	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2704</b>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/2004/phufms-11	Brasil	MS	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2740</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2003/phufms-90	Brasil	MS	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2821</b>	<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	MHOM/IL/1980/FRIEDLIN	Israel	-	CLIOC	SIM	Padronização HRM
<b>IOCL 2823</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2001/RGJ	Brasil	RJ	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2824</b>	<i>L. Viannia braziliensis</i>	L.g/L.b/L.mj			CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2842</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/XXXX/LTCP14438	Brasil	BA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 2906</b>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/2002/LPC-RPV	Brasil	MG	CLIOC	SIM	Padronização HRM
<b>IOCL 2939</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/2007/062	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM

<b>IOCL 3011</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2007/RSC	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3059</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2007/H-174/07	Brasil	CE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3061</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2008/OPS	Brasil	RJ	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3062</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1994/H-3227	Brasil	CE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3141</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2009/214	Brasil	MT	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3162</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2009/217	Brasil	MT	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3163</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2009/228	Brasil	MT	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3212</b>	<i>L. Leishmania infantum</i>	L.mx/L.d/L.a/L.i/L.l			CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3229</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2010/MFA	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3231</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2010/RGA	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3281</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2011/FdeAS-02	Brasil	RO	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3305</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/2011/LT11	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3306</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2011/LT17	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Padronização qPCR
<b>IOCL 3307</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2011/S22	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação HRM

<b>IOCL 3310</b>	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	MHOM/BR/2011/S50	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3311</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2011/S55	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3312</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/2010/S57	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Padronização qPCR
<b>IOCL 3314</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2011/55-AVS	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3315</b>	<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	MHOM/BR/2011/57-GBS	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3327</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2011/RSG	Brasil	PE	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3352</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MCAN/BR/2011/cão LV01	Brasil	Paraná	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3353</b>	<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	MHOM/BR/2011/S88	Brasil	Pará	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3356</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2011/S89	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Padronização e Especificidade e sensibilidade qPCR
<b>IOCL 3358</b>	<i>Leishmania sp.</i>	MHOM/BR/2011/S85	Brasil	PA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3360</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2010/RR/LPC003/ ECCA2010	Brasil	MG	CLIOC	NÃO	Validação HRM

<b>IOCL 3362</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2006/RR/LPC005/ JE2006	Brasil	MG	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3390</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2012/DBS	Brasil	RO	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3394</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2012/LCS02	Brasil	RO	CLIOC	NÃO	Validação e Reprodutibilidade HRM
<b>IOCL 3397</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/2012/APS30	Brasil	RO	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3399</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/2012/FdeAS6AA	Brasil	RO	CLIOC	NÃO	Validação e Reprodutibilidade HRM
<b>IOCL 3523</b>	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	MHOM/BR/2013/25EPF	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3524</b>	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	MHOM/BR/2013/45JOM	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3534</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/1985/BA-69	Brasil	BA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3535</b>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/1987/BA-125	Brasil	BA	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3538</b>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/251	Brasil	RO	CLIOC	NÃO	Validação e Reprodutibilidade HRM

<b>IOCL 3541</b>	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	MHOM/BR/2014/61AAM	Brasil	AM	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3669</b>	<i>L. Viannia panamensis</i>	MHOM/CO/2007/UA3104B	Colômbia	Antioquia	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3572</b>	<i>L. Leishmania mexicana</i>	MHOM/DO/2014/085-36 JTT	República Dominicana	Peravia	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3657</b>	<i>L. Viannia peruviana</i>	MHOM/PE/1990/LCA08	Peru	Ayacucho	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3662</b>	<i>L. Viannia braziliensis</i>	MHOM/PE/2003/LH2287	Peru	Cusco	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3661</b>	<i>L. Viannia braziliensis</i>	MHOM/PE/1991/LC2125	Peru	Cusco	CLIOC	NÃO	Validação HRM
<b>IOCL 3665</b>	<i>L. Viannia braziliensis</i>	MHOM/PE/1991/LC1580	Peru	Cusco	CLIOC	NÃO	Validação HRM
-	<i>Trypanosoma cruzi</i>				LABIMD OE - IOC	-	Especificidade e sensibilidade qPCR
-	<i>Trypanosoma rangeli</i>				LABIMD OE – IOC	-	Especificidade e sensibilidade qPCR
-	<i>Trypanosoma marinkelli</i>				LABIMD OE	-	Especificidade e sensibilidade qPCR

<b>COLPROT 0020</b>	<i>Herpetomonas muscarum</i>				COLPR OT	-	Especificidade e sensibilidade qPCR
<b>COLPROT 0026</b>	<i>Leptomonas pyrrocoris</i>				COLPR OT	-	Especificidade e sensibilidade qPCR
<b>COLPROT 0048</b>	<i>Crithidia fasciculata</i>				COLPR OT	-	Especificidade e sensibilidade qPCR

**Anexo 2.** Amostras clínicas provenientes de pacientes suspeitos de LTA, obtidas do Laboratório de Epidemiologia Genética, da Fiocruz de Rondônia – Brasil, utilizadas para a quantificação da carga parasitária por qPCR e para a validação do HRM.

<b>Amostra</b>	<b>Raspado</b>	<b>cPCR kDNA</b>	<b>cPCR HSP70</b>	<b>Espécie</b>
<b>388</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>389</b>	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>391</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<b>394</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<b>395</b>	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>396</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>397</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>398</b>	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>399</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>400</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>402</b>	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>403</b>	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>404</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>405</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>406</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>408</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>409</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>411</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>412</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>413</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>414</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>415</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>417</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>418</b>	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>419</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>420</b>	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>421</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>422</b>	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>423</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>424</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<b>425</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>426</b>	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>427</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>

428	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
429	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
430	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
431	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
432	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
433	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
434	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
435	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
436	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
437	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
438	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
439	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
440	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
441	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
442	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
443	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
444	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
445	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
446	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
447	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
448	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
449	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
450	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
451	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
452	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
453	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
454	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
455	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
456	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
457	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
458	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) shawi</i>
459	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
460	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
462	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
464	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
465	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
466	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
467	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
468	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
469	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
470	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>

<b>471</b>	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>472</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>473</b>	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>474</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>475</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>476</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>477</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>479</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>480</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>481</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>482</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>484</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>485</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<b>486</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<b>487</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>488</b>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>489</b>	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<b>490</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

**Anexo 3.** Valores médios de  $C_t$  obtidos para os 92 pacientes analisados com os dois alvos estudados (HSP70 e 18S rDNA) e com o alvo controle humano RNase P, em multiplex com cada um dos dois alvos:

<b>Amostra</b>	<b>Média <math>C_t</math> 18S Leishmania</b>	<b>Média <math>C_t</math> RNase P/18S rDNA</b>	<b>Média <math>C_t</math> HSP70</b>	<b>Média <math>C_t</math> RNase P/HSP70</b>
388	33,2854	19,1419	34,590	19,27929878
389	33,6827	21,6950	35,369	22,05628014
391	19,1636	18,5961	33,3317	19,41337681
394	20,4214	21,7479	25,1303	22,79040337
395	25,6344	23,3395	28,0813	23,14663124
396	20,0247	20,2340	21,9396	20,72738743
397	32,8960	21,3795	34,7843	22,29020786
398	35,8524	21,5713	Undetermined	21,99549866
399	19,5476	19,2305	22,6800	21,36642456
400	22,2409	21,1934	23,5117	21,55189228
402	31,5893	21,6545	31,5976	21,57723141
403	Undetermined	20,2428	Undetermined	21,38078117
404	Undetermined	19,3423	Undetermined	20,76049995
405	26,7979	19,8601	28,9200	21,03402424
406	30,9544	19,1801	Undetermined	19,92348099
408	26,4783	19,7956	28,3940	20,383
409	36,9947	20,8086	38,2545	21,4815
411	25,3111	19,5821	26,4720	19,6515
412	20,4722	19,9819	22,0570	20,5515
413	38,6472	18,7125	Undetermined	34,447
414	20,3023	20,4245	21,4730	20,8035
415	34,5285	19,7363	37,0955	19,716
417	27,6170	19,6373	29,5815	19,497
418	30,0602	23,5095	32,1840	24,967
419	25,7840	20,6446	27,0890	21,4275
420	35,8632	20,1966	Undetermined	20,881
421	35,3439	19,3184	35,8280	19,523
422	35,4440	20,5393	36,1670	20,9865
423	24,9459	20,6263	26,1080	21,2855

424	15,4133	19,2882	16,5570	20,183
425	33,2092	20,3522	34,8180	20,142
426	31,8446	20,4080	33,1825	21,1775
427	26,6700	21,0511	27,9725	22,11
428	35,0194	22,8734	36,3240	22,8615
429	34,1740	19,0471	Undetermined	19,2085
430	35,4246	19,1309	Undetermined	19,029
431	36,3289	20,5786	37,5540	22,7315
432	Undetermined	19,4588	Undetermined	20,036
433	35,1328	21,1417	Undetermined	22,647
434	Undetermined	21,9499	Undetermined	24,7755
435	35,0840	18,6956	Undetermined	18,8255
436	23,1729	18,2793	25,1400	19,003
437	29,0713	19,0364	31,3585	19,857
438	34,1989	19,4009	Undetermined	20,017
439	25,9696	18,3694	26,4025	18,9755
440	34,9774	20,9956	Undetermined	20,87
441	25,2149	20,6913	26,3560	20,84
442	26,5434	21,3780	28,9960	21,5225
443	27,5860	18,9921	29,0160	18,968
444	19,2805	19,5403	22,6985	21,8325
445	34,4084	19,8835	35,1165	20,705
446	17,2221	18,3026	18,3785	19,0315
447	24,1342	19,8238	25,9285	19,894
448	26,7963	21,5925	27,4900	22,2555
449	36,5151	20,2212	Undetermined	19,9725
450	27,5142	21,6659	31,4715	23,044
451	27,5856	20,0590	30,0915	20,0425
452	24,9320	19,3119	25,9610	20,0575
453	33,9738	21,3167	35,3465	21,9775
454	23,8864	17,9984	25,0135	18,2975
455	35,0322	20,5687	Undetermined	20,918
456	37,2774	18,5844	Undetermined	18,7335
457	26,1867	20,7747	Undetermined	21,581
458	21,2131	19,0172	31,5400	19,239
459	28,3155	19,8193	30,1715	20,06
460	Undetermined	23,5433	Undetermined	24,163

462	25,9285	19,0550	27,9910	20,1105
464	33,0913	21,0919	36,6915	21,4185
465	36,9161	17,1819	Undetermined	18,217
466	25,1340	16,7856	27,5730	17,86
467	Undetermined	17,7933	Undetermined	18,3585
468	23,8131	20,4827	29,2475	20,7405
469	Undetermined	22,4344	Undetermined	22,7035
470	36,0194	21,5851	Undetermined	21,7595
471	34,1770	19,6539	35,111	20,274
472	32,6191	17,4573	35,6015	18,149
473	34,2155	17,7530	Undetermined	18,256
474	35,9169	18,3189	Undetermined	18,738
475	25,1823	17,8698	27,4610	17,924
476	24,1431	18,9403	25,0155	18,851
477	28,2100	17,8833	30,7490	18,905
479	Undetermined	17,9629	Undetermined	18,3685
480	33,4022	16,9159	36,3700	17,855
481	Undetermined	21,7515	Undetermined	22,7865
482	23,6125	18,2750	25,6180	18,7055
484	27,1315	17,5357	29,1585	18,1875
485	31,4202	17,6493	33,9490	18,7975
486	34,9269	17,8987	36,2310	18,9605
487	34,1701	17,5519	Undetermined	18,7365
488	24,7152	21,0258	26,5405	22,0615
489	23,9290	18,5817	26,5415	19,02055359
490	35,1436	18,8245	Undetermined	19,59

**Anexo 4.** Valores das quantidades de *Leishmania* e DNA humano obtidos para cada duplicata e os valores da quantidade normalizada (parasitas/ $\mu$ g DNA humano) para cada amostra, para o alvo HSP70.

<b>Amostra</b>	<b>Qt Leish (Par/mL)</b>	<b>Qt RNase P (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Qt média normalizada (Par/<math>\mu</math>g)</b>
388	35,67	41,31	0,864
	-	43,75	
389	42,22	6,04	4,26886278
	10,62	6,89	
391	89,54	36,74	2,152582
	76,59	41,00	
394	20055,18	3,92	5,12E+03
395	2461,07	2,99	909,054603
	3145,34	3,16	
396	166902,33	11,71	11126,3535
	172624,05	21,59	
397	59,88	4,47	7,91219215
	16,38	6,77	
398	-	6,88	NEGATIVO
	-	6,56	
399	92037,33	10,76	10168,6173
	116180,37	9,86	
400	58019,47	9,98	6569,40192
	60530,09	8,26	
402	309,58	9,59	29,7275177
	225,76	8,31	
403	-	10,65	NEGATIVO
	-	9,77	
404	-	14,52	NEGATIVO
	-	16,64	
405	1546,68	13,37	123,161427
	1628,46	12,47	
406	-	27,99	NEGATIVO
	-	26,91	
408	2207,47	19,43	112,348098
	2307,18	20,77	

409	4,48	9,54	0,34553914
	2,10	9,52	
411	8391,45	30,03	249,273932
	7953,92	36,30	
412	156277,10	17,10	8765,70811
	157537,42	18,77	
413	-	0,00	NEGATIVO
	-	0,00	
414	208678,04	15,00	15439,6102
	257832,23	15,20	
415	3,63	31,64	0,2512307
	12,23	31,56	
417	863,65	56,79	33,0056913
	1202,91	23,68	
418	165,76	0,87	200,224423
	192,31	0,92	
419	5273,43	9,16	547,740586
	5541,21	10,66	
420	-	14,21	NEGATIVO
	-	14,44	
421	7,24	33,01	0,5358003
	33,52	39,33	
422	-	15,68	1,09E+00
	12,41	11,34	
423	9160,49	12,94	1001,87759
	11861,18	9,15	
424	7227891,55	18,25	290531,236
	5369599,08	29,01	
425	30,62	19,44	1,57E+00
	-	28,79	
426	105,22	11,51	7,91081203
	79,59	11,92	
427	3320,63	5,96	486,603032
	2696,58	6,49	
428	5,83	3,58	3,56904996
	21,41	3,88	
429	-	34,99	NEGATIVO

	-	56,87	
430	-	51,99	NEGATIVO
	-	48,84	
431	-	3,39	1,00E+00
	4,91	4,90	
432	-	25,92	NEGATIVO
	-	24,95	
433	-	4,03	NEGATIVO
	-	4,62	
434	-	1,03	NEGATIVO
	-	1,00	
435	-	47,79	NEGATIVO
	-	70,05	
436	19979,35	57,18	390,682878
	19872,65	46,01	
437	376,85	29,77	10,9403715
	255,43	27,70	
438	-	27,27	NEGATIVO
	-	24,33	
439	8729,48	40,69	169,792044
	8391,45	67,12	
440	-	11,08	NEGATIVO
	-	18,79	
441	8596,12	9,65	647,050655
	9068,97	22,47	
442	1799,83	8,67	167,63533
	1263,99	9,90	
443	1753,46	59,03	28,3663403
	1263,15	46,73	
444	26660,73	2,38	13868,7034
	391238,75	23,65	
445	15,96	14,99	1,66587162
	39,41	17,38	
446	1789024,46	64,44	37991,5642
	1893762,80	39,27	
447	11363,79	25,97	420,127761
	12158,60	30,20	

448	4328,50	4,99	744,216216
	3946,58	6,35	
449	-	36,20	NEGATIVO
	-	19,47	
450	322,64	2,74	91,2522464
	256,46	3,97	
451	733,02	33,71	29,7034457
	716,05	19,01	
452	10033,52	22,38	459,100466
	13184,33	28,06	
453	29,24	8,39	3,17614428
	15,81	5,52	
454	19516,73	112,39	284,248436
	24097,76	61,03	
455	-	12,59	NEGATIVO
	-	15,50	
456	-	53,68	NEGATIVO
	-	70,67	
457	-	7,58	NEGATIVO
	-	10,45	
458	313,49	44,93	6,32245311
	240,82	42,49	
459	696,20	28,23	27,6078723
	677,35	22,17	
460	-	1,63	NEGATIVO
	-	1,46	
462	2756,81	20,98	122,583245
	3168,63	27,85	
464	5,82	7,25	0,88248233
	13,12	13,64	
465	-	107,98	NEGATIVO
	-	70,87	
466	3868,12	91,11	35,7132445
	3951,87	136,40	
467	-	75,64	NEGATIVO
	-	83,47	
468	1391,89	19,18	81,3658298

	1167,22	12,94	
469	-	4,41	NEGATIVO
	-	3,91	
470	-	9,13	NEGATIVO
	-	6,81	
471	-	22,00	1,18E+00
	25,17	21,27	
472	24,31	98,45	0,2027249
	13,51	85,25	
473	-	93,05	NEGATIVO
	-	77,99	
474	-	65,14	NEGATIVO
	-	57,88	
475	4296,74	87,00	40,4746321
	4133,13	130,95	
476	19872,65	72,13	400,973268
	23602,89	44,84	
477	328,97	61,61	9,45239569
	661,67	48,78	
479	-	72,97	NEGATIVO
	-	85,36	
480	10,58	119,32	0,09725556
	11,10	104,87	
481	-	3,80	NEGATIVO
	-	4,06	
482	14229,76	63,92	230,642545
	14714,06	61,66	
484	1419,17	72,08	15,6797889
	1289,63	110,50	
485	89,24	54,19	1,08545576
	33,63	64,18	
486	11,89	56,25	2,11E-01
	-	49,54	
487	-	60,45	NEGATIVO
	-	62,50	
488	7906,15	7,12	1219,5617
	7702,43	5,80	

489	7934,55	54,93	154,180775
	7664,93	46,76	
490	-	39,78	NEGATIVO
	-	29,79	

**Anexo 5.** Quantidades médias de *Leishmania* e DNA humano, com o alvo 18S rDNA e também a quantidade normalizada (Eq. Par./ $\mu$ g DNA humano) para cada amostra dos 92 pacientes analisados:

	<b>Par. Eq./mL</b>	<b><math>\mu</math>g/mL</b>	<b>Eq. Par/<math>\mu</math>g</b>
<b>Amostra</b>	<b>Quantidade média Leishmania</b>	<b>Quantidade média DNA humano</b>	<b>Carga normalizada</b>
388	37,334	42,274	0,883157025
389	27,639	9,261	2,984267932
391	511.509,063	57,887	8836,327333
394	215.044,688	8,978	23951,66495
395	6.353,071	3,513	1808,668066
396	281.399,469	21,912	12842,43355
397	47,051	11,154	4,218400056
398	6,525	9,997	0,652638901
399	388.780,563	41,371	9397,429207
400	64.200,703	12,550	5115,775731
402	117,471	9,509	12,35419702
403	NA	21,907	<b>NEGATIVO</b>
404	NA	37,807	<b>NEGATIVO</b>
405	2.918,492	27,347	106,7196628
406	175,310	41,374	4,237154246
408	3.637,649	28,512	127,5812371
409	2,950	15,645	0,188522962
411	8.032,498	32,489	247,2358529
412	209.900,641	26,705	7859,866986
413	0,989	53,753	0,018404642
414	233.094,031	19,800	11772,27545
415	16,652	29,390	0,566587808
417	1.664,426	31,195	53,35544579
418	319,850	3,183	100,4975259
419	5.745,641	17,252	333,036022

420	6,336	22,873	0,276993647
421	9,056	37,831	0,239381609
422	8,409	18,321	0,458971042
423	10.117,203	17,589	575,1920189
424	6.350.526,000	38,510	164907,4209
425	42,547	21,414	1,986874195
426	99,286	20,330	4,883707892
427	3.158,958	13,546	233,2090994
428	11,298	4,623	2,443713181
429	19,832	44,173	0,448960345
430	8,520	42,206	0,201861389
431	4,625	17,968	0,257392904
432	NA	34,612	<b>NEGATIVO</b>
433	10,376	12,902	0,804260076
434	NA	7,975	<b>NEGATIVO</b>
435	10,724	54,567	0,196527032
436	33.662,938	70,326	478,6697419
437	624,277	45,840	13,61846187
438	19,502	36,224	0,538378182
439	5.066,205	65,855	76,93010126
440	11,525	14,012	0,822532731
441	8.480,377	16,748	506,3521071
442	3.440,387	11,388	302,1148032
443	1.710,386	45,571	37,53242382
444	464.857,781	33,044	14067,9273
445	18,159	26,949	0,673846353
446	1.867.367,500	68,413	27295,49981
447	17.566,080	28,366	619,2671279
448	2.897,966	9,859	293,9507853
449	4,080	22,079	0,184805279
450	1.784,201	9,497	187,8655163
451	1.744,896	24,384	71,55894632

452	10.264,900	37,921	270,6947511
453	22,705	11,592	1,958657975
454	21.140,348	81,864	258,2375634
455	11,451	18,144	0,631086394
456	2,841	58,064	0,048935576
457	4.390,639	15,936	275,5140688
458	127.335,141	44,923	2834,52356
459	1.039,375	28,371	36,63478501
460	NA	3,145	<b>NEGATIVO</b>
462	5.216,809	43,905	118,8202551
464	43,067	13,402	3,213546814
465	3,110	132,494	0,023475674
466	8.916,205	168,129	53,03203491
467	NA	92,377	<b>NEGATIVO</b>
468	21.780,605	18,948	1149,501394
469	NA	6,011	<b>NEGATIVO</b>
470	5,701	9,882	0,576864213
471	22,605	30,881	0,73199275
472	57,110	112,850	0,506064887
473	19,284	94,885	0,203236645
474	6,109	67,831	0,090063543
475	8.627,928	90,120	95,73863942
476	17.460,953	46,982	371,6528028
477	1.142,152	89,086	12,82075188
479	NA	83,791	<b>NEGATIVO</b>
480	35,663	154,998	0,230088608
481	NA	8,957	<b>NEGATIVO</b>
482	24.917,340	70,054	355,6866374
484	2.328,168	107,954	21,56621826
485	138,928	100,767	1,378700081
486	12,834	86,812	0,147832703
487	19,885	108,505	0,183261601

488	11.821,791	13,877	851,877638
489	20.186,436	58,083	347,5453275
490	10,301	50,373	0,204501003